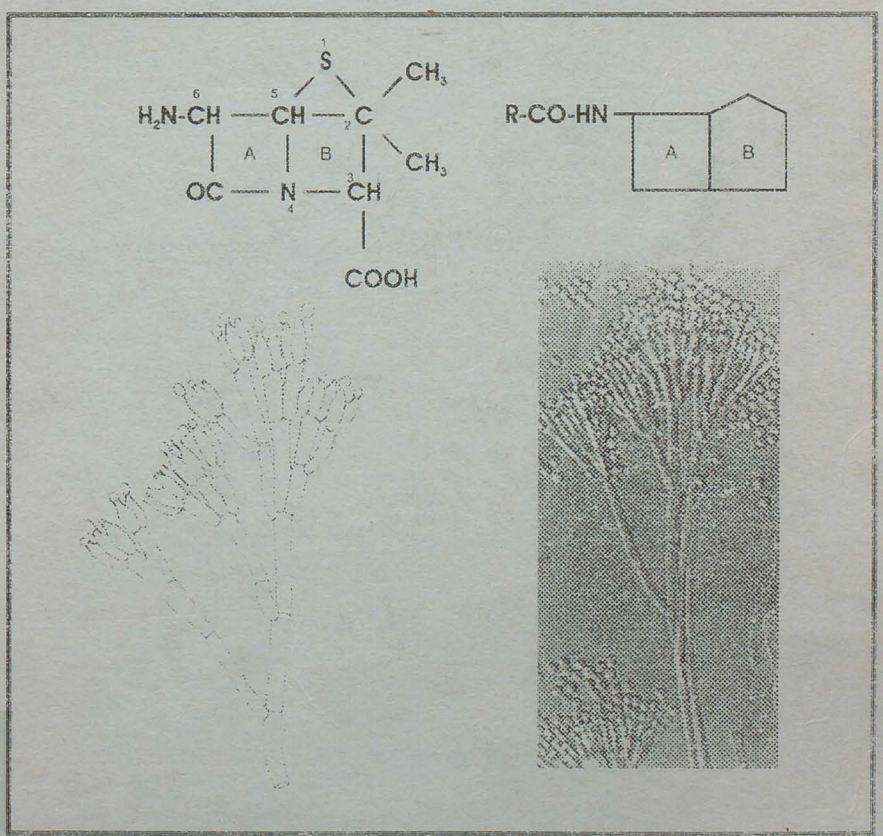
Lidia Popa • Victoria Herlea • Dolna Bulai

MICROBIOLOGIE INDUSTRIALĂ



Editura Universităţii din Bucureşti

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Lidia Popa • Victoria Herlea • Doina Bulai

MICROBIOLOGIE INDUSTRIALĂ

BL 245

Editura Universităţii din Bucureşti
– 2002 –

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Referenți științifici: *Prof. dr. Dana IORDĂCHESCU*
Conf. dr. Tatiana VASSU

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
BUCUREȘTI
COTA IV 517135

495/02

© Editura Universității din București
Șos. Panduri 90-92, București - 76235; Tel./Fax: 410.23.84
E-mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

B.C.U. Bucuresti
C20021580

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
POPA, LIDIA
Microbiologie industrială / Lidia Popa, Victoria Herlea, Doina Bulai. - Bucureşti : Editura Universității din Bucureşti, 2002
p. ; cm.
Bibliogr.
ISBN 973-575-613-7

I. Herlea, Victoria
II. Bulai, Doina

579.66(075.8)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CUPRINS

Capitolul I:
INTRODUCERE ÎN MICROBIOLOGIA INDUSTRIALĂ
1. Obiectul şi importanța domeniului 7
2. Microorganismele folosite în industrie..... 10
2.1 Principii de selecționare a microorganismelor folosite în industrie 10
2.2 Principii de conservare a microorganismelor folosite în industrie 15
3. Condițiile necesare realizării unui proces microbiologic industrial 18
3.1 Compoziția mediului de cultură 18
3.2 Temperatura 20
3.3 Valoarea pH 20
3.4 Aerarea 21
3.5 Agitarea 23
3.6 Asepsia 24
4. Etapele necesare realizării unui proces microbiologic industrial 25
4.1 Etapa de laborator 25
4.2 Etapa de stație pilot 26
4.3 Etapa de producție industrială 26
4.4 Separarea produşilor finali 27
5. Clasificarea produşilor microbieni sub aspect fiziologico-metabolic 28

Capitolul II:
PRODUCEREA DE BIOMASĂ, RESPECTIV DE PROTEINĂ DE CĂTRE MICROORGANISME 31
1. Microorganisme utilizate ca sursă de proteină 32
1.1 Bacterii 33
1.2 Drojdii (levuri) 33
1.3 Mucegaiuri 34
1.4 Alge 34
2. Materii prime utilizate pentru producerea microbiană de biomasă (respectiv de proteină) 34
2.1 Glucide 34

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.2 Produse petroliere 35
2.3 Metan 36
2.4 Alcooli 36
3. Metabolismul utilizării alcanilor 37
3.1 Pătrunderea alcanilor în celula microbiană 37
3.2 Oxidarea inițială a moleculaei de alcan 38
3.3 Metabolizarea ulterioară a moleculei de alcan oxidate 39
4. Metabolismul utilizării metanului şi metanolului 41
4.1 Utilizarea metanului şi metanolului ca sursă de energie 41
4.2 Utilizarea metanului şi metanolului ca sursă de carbon (pentru sinteza de constituenți celulari) 44
5. Obținerea unor tulpini microbiene cu proprietăți superioare, prin tehnici de inginerie genetică 45
6. Tehnologia obținerii de biomasă microbiană 50
6.1 Factori care condiționează producerea de biomasă microbiană. 50
6.2 Producerea de biomasă microbiană în funcție de microorganismele utilizate 51
7. Probleme privind utilizarea actuală şi de perspectivă a microorganismelor ca sursă de proteine 55

Capitolul III:
PRODUŞI FINALI AI METABOLISMULUI ENERGETIC: PRODUŞI DE FERMENTAȚIE
1. Fermentația alcoolică 58
1.1 Drojdii 58
1.2 Alte microorganisme preoducătoare de fermentație alcoolică ... 61
1.3 Substratul de fermentație 61
1.4 Biochimia fermentației alcoolice 62
1.5 Efectul Pasteur 68
1.6 Efectul Crabtree 70
1.7 Factorii care influențează fermentația alcoolică 71
1.8 Etanol din sisteme de celule imobilizate 75
1.9 Industrii bazate pe fermentația alcoolică 76
2. Fermentația lactică 86
2.1 Bacteriile lactice 86
2.2 Biochimia fermentației lactice 88
2.3 Factorii care influențează fermentația lactică 93
2.4 Industrii bazate pe fermentația lactică 94
3. Fermentatia butirică şi acetono-butilică 99
3.1 Biochimia fermentațiilor butirica şi acetono-butilică 100
3.2 Fermentația acetono-butilică 102

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Capitolul IV:
METABOLIȚI PRIMARI 104
1. Acidul citric 104
1.1 Microorganisme producătoare 104
1.2 Factorii care influențează producerea de acid citric 104
1.3 Reglarea biosintezei şi acumulării acidului citric 108
1.4 Cinetica producerii acidului citric 111
1.5 Producerea industrială şi utilizările acidului citric 111
2. Aminoacizii 113
2.1 Aspecte generale priivnd producerea microbiologică de aminoacizi 113
2.2 Factorii care condiționează producerea microbiologică de aminoacizi 116
2.3 Acidul glutamic 120
2.4 Lizina 129
3. Vitamine 133
3.1 Riboflavina 134
3.2 Vitamina B12 136

Capitolul V:
METABOLIȚI SECUNDARI: ANTIBIOTICELE 141
1. Etapele producerii unui antibiotic 142
2. Clasificarea antibioticelor 144
3. Modul de acțiune al antibioticelor 144
4. Utilizările antibioticelor 146
5. Descrierea principalelor antibiotice 147
6. Reglarea biosintezei antibioticelor 156

Capitolul VI:
ENZIME 161
1. Microorganisme folosite pentru producerea de enzime 162
2. Producerea industrială a enzimelor microbiene 164
2.1 Selectarea microorganismelor bune producătoare de enzime... 165
2.2 Stabilirea condițiilor optime pentru obținerea enzimei dorite... 165
2.3 Producerea industrială propriu-zisă 165
2.4 Separarea enzimelor 166

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3. Principalele preparate enzimatice microbiene şi aplicaţiile lor practice 167
3.1 Hidrolaze: glicozidaze; proteaze; amidaze 168
3.2 Oxido-reductaze 189
3.3 Izomeraze 190

Capitolul VII:
BIODERIVAŢI (PRODUŞI DE BIOCONVERSIE) 192
1. Acidul acetic 192
1.1 Microorganisme producătoare 192
1.2 Biochimia formării acidului acetic 193
1.3 Producerea industrială a acidului acetic 194
2. Acidul gluconic 195
2.1 Microorganisme producătoare 195
2.2 Biochimia producerii acidului gluconic 196
2.3 Producerea industrială 197
2.4 Utilizările acidului gluconic 198
3. Transformări ale steroizilor şi sterolilor 198
4. Transformări ale compuşilor nesteroidici: acidlul L-ascorbic (vitamina C) 204

Capitolul VIII:
POLIZAHARIDE EXTRACELULARE MICROBIENE 205
1. Microorganisme producătoare şi clasificare 205
2. Biosinteza 206
3. Principalele polizaharide microbiene de importanţă comercială
4. Utilizările exopolizaharidelor microbiene 210

Bibliografie 213

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL I

INTRODUCERE ÎN MICROBIOLOGIA INDUSTRIALĂ

1. Obiectul şi importanţa domeniului

Microbiologia industrială este un domeniu al Microbiologiei aplicate care studiază utilizarea microorganismelor pentru obţinerea de substanţe utile în alimentaţie, medicină sau diverse industrii. De obicei, aceste substanţe sunt compuşi secretaţi în mediu în timpul creşterii microorganismelor, dar pot fi şi substanţe care intră în constituţia celulei microbiene.

Industria microbiologică s-a dezvoltat datorită progreselor uluitoare ale microbiologiei, biochimiei, chimiei şi tehnologiei. Nu există un domeniu în care să întâlnim o atât de armonioasă şi eficientă îmbinare a chimiei, biochimiei, fizicii, matematicii şi tehnologiei cu biologia, ca în microbiologia industrială şi în acelaşi timp, nici un alt domeniu al biologiei, nu este mai strâns legat de producţia de bunuri materiale şi mai profund implicat în dezvoltarea economică a societăţii, ca această disciplină, ale cărei baze ştiinţifice au fost puse abia de un secol.

În dezvoltarea microbiologiei industriale, deosebim trei faze succesive:

♦ Prima fază, al cărei debut corespunde celor mai vechi timpuri şi a durat până în anii 1930 – 1940, a început cu producerea berii, a vinului, a produselor lactate fermentate, a alcoolului distilat şi a continuat cu producerea de solvenţi şi acizi organici. Este perioada studierii în special a proceselor numite fermentaţii: fermentaţia alcoolică, fermentaţia lactică, fermentaţia propionică, fermentaţiile butirică şi acetono-butilică. Deşi unele din aceste fermentaţii, ca de exemplu fermentaţia alcoolică sau fermentaţia lactică, erau cunoscute din cele mai vechi timpuri, bazele studiului ştiinţific al acestor procese au fost puse între anii 1853-1862, odată cu lucrările lui Pasteur.

Două date sunt importante în această perioadă, deoarece au deschis drumul spre faza următoare: anul 1923, când, ca urmare a descoperirii că mucegaiurile sunt capabile să acumuleze în mediu, în anumite condiţii, mari cantităţi de acizi organici, a luat fiinţă în S.U.A. prima fabrică producătoare de acid citric, pe cale microbiologică cu ajutorul mucegaiului *Aspergillus niger* şi anul 1928, când a fost descoperită de către Fleming prima substanţă elaborată de microorganisme şi dotată cu proprietăţi antimicrobiene: **penicilina**.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

♦ Faza a doua (1940 – 1970) este strâns legată de dezvoltarea impetuoasă a biochimiei şi geneticii şi începe cu anul 1942, când s-a trecut la producţia industrială a penicilinei. Anul 1943 marchează descoperirea de către Waksman a antibioticului **streptomicina**, activ contra bacteriei *Mycobacterium tuberculosis*, agentul patogen al tuberculozei. După această dată, cercetările în acest domeniu iau o amploare deosebită şi astfel, apar noi şi noi antibiotice: tetraciclinele, cloramfenicolul, eritromicina, bacitracina, kanamicina, nistatina, etc.

Începând din 1950, progresele realizate în domeniul microbiologiei industriale sunt de-a dreptul uluitoare. Pe cale microbiologică se obţin în prezent substanţe pentru care, sinteza chimică este grea sau chiar imposibilă, ca de exemplu: aminoacizi, vitamine, nucleotide, hormoni steroizi, alcaloizi, enzime, polimeri de tipul dextranului şi xantanului, proteine alimentare şi furajere. O listă a principalelor substanţe obţinute cu ajutorul microorganismelor este dată în tabelul 1.

Tabelul 1. Principalele substanţe obţinute cu ajutorul microorganismelor.

Substanţa produsă	Domenii de utilizare
Solvenţi: etanol, butanol, acetonă	Industria chimică şi alimentară
Acizi organici: acetic, lactic, citric, gluconic, fumaric	Industria alimentară, chimică şi farmaceutică
Aminoacizi Vitamine Nucleotide	Industria alimentară şi farmaceutică
Proteine alimentare şi furajere Lipide	Industria alimentară
Antibiotice Hormoni steroizi şi alţi hormoni Alcaloizi Vaccinuri Interferon	Industria farmaceutică
Poliozide: dextran, manan, levan, xantan	Industria alimentară, petroliferă şi alte industrii
Enzime	Industria alimentară, chimică, farmaceutică şi alte industrii
Gibereline şi alţi hormoni de creştere ai plantelor Insecticide	Agricultura

Aceasta fază a fost caracterizată, din punct de vedere al metodelor genetice folosite, prin utilizarea intensă a tehnicilor de mutageneză pentru selecţionarea de microorganisme înalt producătoare sau cu activităţi noi, superioare.

♦ Faza a treia, care începe cu anul 1970, corespunde introducerii progresive a unor metode genetice noi şi în special a tehnicilor de inginerie genetică, tehnici care permit obţinerea de microorganisme "programate" să desfăşoare activităţi metabolice de sinteză sau de catabolism dorite. Această fază corespunde obţinerii cu ajutorul unor astfel de microorganisme "programate" genetic, a unor hormoni de mare importanţă ca: somatostatina (1977), insulina (1978), somatotropina (1979-1980) sau a unor substanţe cu rol în stimularea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sistemului imunitar ca: interferon (1980-1982) şi vaccinuri (vaccinul antihepatitic B – 1981; vaccinul împotriva turbării – 1982; vaccinul împotriva sifilisului – 1982 şi altele).

Această ultimă etapă corespunde de fapt dezvoltării unei ştiinţe noi, care s-a afirmat tot mai mult în ultimul deceniu, numită *Biotehnologie*, bazată pe utilizarea industrială a microorganismelor reprogramate genetic pentru a le face să sintetizeze produşi complet diferiţi de cei pe care îi produc în mod normal, respectiv produşi sintetizaţi în mod normal în celulele animale sau vegetale.

Acestui prim element grefat pe ceea ce a fost şi este microbiologia industrială, i s-a adăugat un al doilea, reprezentat de utilizarea directă a celulelor animale sau vegetale cultivate *in vitro* şi mai recent, a plantelor şi animalelor modificate prin tehnici de inginerie genetică. În felul acesta, cadrul conceptual al biotehnologiei s-a extins de la sfera de activitate a microorganismelor la ansamblul sistemelor biologice vii.

Revenind la microbiologia industrială, trebuie subliniat şi faptul că, în prezent, aria ei de investigaţie s-a extins şi asupra unor domenii mai puţin previzibile. Dintre acestea, patru merită a fi menţionate în mod deosebit:

• industria petroliferă, unde, începând cu 1962, procedeele microbiologice sunt aplicate pentru recuperarea secundară a zăcămintelor de ţiţei. Ca urmare a cercetărilor efectuate iniţial de un colectiv aparţinând Institutului de Biologie al Academiei - Bucureşti, aceste procedee au fost testate cu succes în mod experimental şi la noi în ţară;

• industria extractivă, unde, începând din 1967, s-a reuşit cu ajutorul bacteriilor din genul *Thiobacillus* extragerea cu un randament de 100% a cuprului din calcopirită, procedeu aplicat deja la scară industrială. De asemenea, precipitarea sulfului cu *Thiobacillus thiooxidans* dă o productivitate remarcabilă. Se consideră că în viitor, elemente chimice ca: fierul, argintul, cuprul, nichelul, molibdenul, zincul, aurul şi altele, vor putea fi extrase din minereurile sărace, neutilizabile, cu ajutorul bacteriilor;

• combaterea poluării mediului înconjurător prin descompunerea pe cale microbiologică a substanţelor organice din apele reziduale uzinale sau menajere;

• valorificarea cantităţilor uriaşe de biomasă vegetală în vederea obţinerii de energie, sub formă de etanol şi biogaz.

Această succintă prezentare demonstrează faptul că microbiooogia industrială este o ştiinţă în plină evoluţie, căreia i se prevede în viitor o importanţă considerabilă pentru dezvoltarea economică mondială.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. Microorganismele folosite în industrie

Diversele microorganisme utilizate în microbiologia industrială aparţin principalelor tipuri cunoscute: bacterii, fungi microscopici (drojdii şi mucegaiuri) şi microalge.

Microorganismele folosite în industrie trebuie să posede următoarele caracteristici:

• să fie culturi pure, nu numai lipsite de alte microorganisme vizibile la microscop, ci şi lipsite de fagi;

• să crească rapid şi viguros după inoculare, pentru a obţine cantităţi mari de inocul, înainte de procesul industrial;

• să crească pe un substrat ieftin, pe care să-l transforme în cea mai mare parte şi într-un timp cât mai scurt, producând cantităţi maxime de produs util şi cantitatăţi minime de produse secundare;

• să tolereze cantităţi mari de produs final, fără să-l metabolizeze, permiţând acumularea lui în mediu şi separarea uşoară de alţi produşi;

• să nu producă substanţe toxice;

• să manifeste rezistenţă la contaminare, fie prin capacitatea de creştere la pH scăzut sau la temperaturi ridicate, fie prin elaborarea rapidă de inhibitori microbieni;

• să fie stabile genetic, adică, să-şi conserve în timp caracterele biochimice, fără riscul variaţiilor genetice.

Microorganismele care îndeplinesc aceste condiţii pot fi izolate din natură sau obţinute din colecţii de culturi. Cele mai renumite colecţii de culturi sunt:

- ATCC (American Type Culture Collection), Washington, U.S.A.;
- NCIB (National Collection of Industrial Bacteria), Aberdeen, Scoţia;
- NCTC (National Collection of Type Culture), Londra, Anglia.

2.1 Principii de selecţionare a microorganismelor folosite în industrie

Sursele tradiționale de microorganisme utilizate în industrie sunt reprezentate de izolate din medii naturale (sol, organisme animale, etc.) sau provenite din colecții de microorganisme şi supuse unor procedee convenționale de ameliorare (în special prin mutageneză) sau, în ultimele două decenii, prin tehnici de inginerie genetică (tehnologia ADN recombinant, hibridări de protoplaşti etc.).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Iniţial, procesele microbiologice industriale se produceau sub acţiunea microflorei spontane, care se găsea pe suprafaţa sau în interiorul produsului supus transformării. S-a observat însă, că microorganismele neselecţionate pot fi slab sau inegal active şi de asemenea, pot fi asociate cu specii dăunătoare, a căror activitate diminuează calitatea produsului final. În prezent, pentru a preveni aceste inconveniente, se recurge la selecţionarea microorganismelor utilizate în industrie. În acest fel, se obţin în mod constant, produse de calitate superioară, se scurtează durata procesului tehnologic si se îmbunătăţeşte randamentul, deoarece, tulpinile selecţionate suportă concentraţii mari de produs final.

Selecţionarea microorganismelor este în funcţie de scopul urmărit, adică, fie obţinerea de biomasă, fie formarea unei anumite enzime, fie mărirea activităţii unei enzime existente. Procesul trebuie dirijat astfel încât, celelalte activităţi ale tulpinii microbiene să fie reduse şi să fie crescută numai activitatea care ne interesează. Acest lucru se poate realiza acţionând asupra principalelor mecanisme de reglare metabolică la nivel molecular: inhibiţia *feed-back* a activităţii enzimelor (retroinhibiţie), inducţia sintezei enzimelor, represia sintezei enzimelor. Acţionând asupra acestor mecanisme şi în special, prin dereglarea controlului *feed-back*, se poate ajunge în industrie la acumularea în mediu de diferiţi produşi utili ca: acizi organici, aminoacizi, vitamine, antibiotice, enzime, etc.

Selecţionarea microorganismelor pentru industrie se poate face pe două căi principale:

1. Izolarea din medii naturale

Aproape toate procesele microbiologiece industriale necesită izolarea iniţială a culturii din natură, urmată de cultivări şi optimizare la scară mică, înainte ca producerea la scară mare să devină o realitate. Utilizarea abordării ecofiziologice pentru izolare poate furniza posibilitatea evaluării şi testării (*screening*) unei largi varietăţi de microorganisme pentru produsul dorit.

Calea izolării din medii naturale a unui microorganism, care prin însăşi structura sa genetică posedă caracterele dorite de noi folosită de multă vreme, a dus la dezvoltarea unor industrii microbiologice importante ca: industria spirtului şi a băuturilor alcoolice, bazată pe proprietatea drojdiilor de a produce şi acumula în mediu etanol; industria produselor lactate, bazată pe proprietatea bacteriilor lactice de a transforma glucidele din mediu în acid lactic; industria drojdiei furajere, bazată pe proprietatea drojdiilor de a acumula biomasă, din care, 50% este proteină. Această cale este folosită în unele cazuri şi în prezent. De exemplu, producătorul de acid glutamic izolat de Kinoshita, *Corynebacterium glutamicum*, ca şi speciile de *Brevibacterium* folosite în acelaşi scop, prezintă două caracteristici importante

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

pentru producerea acidului glutamic: deficienţa în enzima α–cetoglutarat-dehidrogenază şi necesitatea de biotină pentru creştere. Deficienţa în α–cetoglutarat-dehidrogenază blochează ciclul Krebs la α–cetoglutarat, care este astfel transformat în L-glutamat, iar necesitatea în biotină face ca în medii cu conţinut scăzut de biotină microorganismul să sufere alterări ale membranei plasmatice, care permit acumularea glutamatului în mediu (cap. IV). În mod similar, *Corynebacterium glutamicum*, folosit la producţia industrială de L-lizină, posedă enzima iniţială a ramurii lizinei-dihidrodipicolinat-sintetaza rezistentă la inhibiţia *feed-back* exercitată de lizină. Aceasta explică de ce în industrie este preferată această bacterie în locul bacteriei *Escherichia coli*, la care această inhibiţie este prezentă (cap. IV).

Producţia de alcaloizi de către *Claviceps paspali* este puternic stimulată de un precursor, triptofanul; la acest organism, prima enzima a ramurii biosintezei triptofanului – antranilat-sintetaza este rezistentă la inhibiţia *feed-back* exercitată de triptofan.

Astfel, pronindu-se de la tehnicile tradiţionale de izolare din natură a unor tulpini producătoare de compuşi utili s-a ajuns la imaginarea unor **strategii moderne de selecţie** bazate pe metode noi de detecţie a microorganismelor active.

Strategiile orientate spre o anumită ţintă (*Targetted screens*), utilizează metode specifice de detecţie a unor producători de enzime, de substanţe chimice utile sau produse biologice de interes, bazate pe înţelegerea ştiinţificăa unor mecanisme sau activităţi.

Un caz tipic pentru importanţa şi eficienţa acestor strategii de *screening* "inteligent" este furnizat de rezultatele unui grup de cercetători japonezi: după ce au izolat şi descris un microorganism util, ca un gen nou de actinomicete, *Kitasato sporia*, au urmărit descoperirea în acel mediu natural a altor membrii ai aceluiaşi taxon sau ai unor taxoni înrudiţi. Testarea s-a făcut pe baza prezenţei în peretele celular a acizilor mezo- şi LL-diaminopimelic.

Pornind de la tulpina tip izolată iniţial *Kitasatosporia griseola*, care produce un antibiotic nou, setamicina, în interval de 5 ani au dost izolate patru specii de *Kitasatosporia* producătoare de substanţe deosebit de utile.

Conceptul de *screening inteligent* a fost iniţiat în cursul tentativelor de izolare de noi antibiotice, pe baza cunoaşterii chimiei biosintezei peretelui celular bacterian. În acest context, cunoaşterea faptului că penicilina are ca ţintă de acţiune enzima transpeptidaza, a permis obţinerea unor inhibitori specifici ai acestei enzime şi ai D-ala-D-ala-carboxipeptidazei şi a dus la descoperirea în termen foarte scurt a noi antibiotice β-lactamice ca: thienamicina, cefamicinele, carbapenemele.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ulterior, sistemul de *screening* "inteligent" orientat spre anumite ţinte, a fost extins la întreaga gamă de produse biofarmaceutice. Marea diversitate genetică şi biochmică (metabolică a microorganismelor este ilustrată şi de diversitatea extraordinară a metaboliţilor lor, prezenţi în lichide de cultură, numai în mică parte descoperiţi şi exploataţi. Activitatea lor se explică, în cea mai mare parte, pe calea obiectivelor ţintă ale strategiilor inteligente, respectiv, pe calea inhibării unor enzime-cheie sau a legării de unii receptori celulari.

Necesitatea de a supune testelor de *screening* un număr mare de probe într-o perioadă de timp cât mai scurtă a condus la dezvoltarea unor teste semiautomatizate. De la utilizarea staţiilor de pipetare automată şi miniautomatizarea analizelor pentru economisirea reactivilor de analiză, s-a ajuns în ultimii 5 ani la noi tehnologii de *screening* al produşilor microbieni într-un sistem de robotică total integrat.

2. Modificarea sau eliminarea mecanismelor de reglare metabolică, care se poate realiza fie prin **variabilitate fenotipică**, fie prin **variabilitate genetică**. În cazul **variabilităţii fenotipice**, prin modificarea unor condiţii de mediu se pot produce variaţii în sistemul enzimatic al microorganismelor. De exemplu, adăugarea de inductori în mediu poate determina o producţie mărită de enzimă. Astfel, formarea amilazei la microorganisme este indusă de prezenţa în mediul de cultură a amidonului, dextrinei sau maltozei care servesc ca inductori. La fel, inhibiţia *feed-back* poate fi eliminată, prin micşorarea concentraţiei produsului final inhibitor sau prin adăugarea în mediu a unei substanţe care produce reversia inhibiţiei *feed-back*. Astfel de variaţii însă nu sunt stabile şi nu se transmit ereditar, nefiind înscrise în genotipul microorganismului respectiv.

În cazul **variabilităţii genetice** însă, variaţiile sunt stabile şi se transmit ereditar, deoarece apar prin modificări la nivelul aparatului genetic al microorganismului respectiv. Variabilitatea genetică se realizează pe doua căi: prin **mutageneză** şi prin **recombinare genetică**.

Mutageneza, în special **mutageneza indusă**, prin folosirea unor agenţi mutageni fizici (radiaţii ionizante şi neionizante) sau chimici (etil-metan-sulfonat, azot-iperită, N-metil-N'- nitro - N-nitrozoguanidină) permite modificarea sau eliminarea unor mecanisme de reglare metabolică şi obţinerea diferitelor tipuri de mutante ca: **mutante constitutive** la care a fost abolită **represia sintezei enzimelor**, deci, capabile să producă enzima în prezenţa represorilor; **mutante constitutive** la care a fost abolită **inducţia sintezei enzimelor**, deci capabile să producă enzima, fără adaosul în medii de substanţe inductoare; **mutante rezistente la represia prin catabolit a sintezei enzimelor; mutante rezistente la inhibiţia**

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

feed-back **a activităţii enzimelor**, la care enzimele respective şi-au pierdut proprietăţile alosterice şi ca urmare, produc în exces produsul final şi-l elimină în mediu. Un caz particular şi interesant în acelaşi timp, este cel al mutantelor rezistente la inhibitori ai creşterii, analogi structurali cu produsul final de biosinteză.

Aceste mutante, numite **mutante reglatoare** (cap. IV) produc o cantitate mare de produs final, deoarece sunt rezistente la inhibiţia *feed-back* produsă atât de produsul final, cât şi de analogul său structural. Asemenea mutante se folosesc în prezent la producerea industrială a lizinei pe cale microbiologică.

Recombinarea genetică se foloseşte în selecţia microorganismelor industriale, atât pentru bacterii, cât şi pentru fungii microscopici: drojdii şi mucegaiuri. În cazul **bacteriilor**, se folosesc mecanismele de transfer genetic cunoscute, în special transformarea genetică şi transducţia, pentru inducerea de caractere noi. Astfel, transducţia prin actinofagi a fost folosită la selecţia actinomicetelor producătoare de streptomicină, eritromicină, tetraciclină. Mai recent, recombinarea genetică la bacterii s-a realizat prin tehnica fuziunii de protoplaşti şi prin tehnicile de ADN recombinant sau de inginerie genetică.

Fuziunea de protoplaşti presupune existenţa a două microorganisme caracterizate genetic, care pot fi urmărite sub raportul contribuţiei lor la formarea hibridului, prin aşa numiţii *markeri genetici*, de obicei, markeri de auxotrofie. Recombinarea genetică ce are loc ulterior fuziunii, duce la o reasortare a materialului genetic pus la dispoziţie de cele doua tulpini. Fuziunea de protoplaşti este considerată în prezent ca una din cele mai importante tehnologii în obţinerea de recombinanţi utili pentru industria de biosinteză. În cazul bacteriilor, de exemplu, această tehnologie a fost aplicată cu succes actinomicetelor producătoare de antibiotice ca şi pentru obţinerea de recombinanţi producători de lizină.

Tehnologia ADN recombinant presupune utilizarea tehnicilor de manipulare artificială a moleculelor de acizi nucleici, în scopul de a transfera gene de la o specie la altă specie, conferindu-i acesteia din urmă caractere noi. Pe această cale s-au obţinut o serie de realizări importante, ca de pildă, transferul la *E. coli* a genelor care codifică sinteza *somatostatinei*, hormon uman, secretat de hipotalamus, care reglează eliberarea hormonului de creştere şi a insulinei şi transferul genelor care codifică sinteza *insulinei*, din celule pancreatice animale tot la *E. coli*. Aceste tehnici au câştigat tot mai mult teren pentru industria de biosinteză, urmărindu-se obţinerea de bacterii care să sintetizeze antibiotice noi, enzime noi, proteine cu mare valoare alimentara, care să degradeze hidrocarburile din petrol sau diferite rezidii industriale.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cazul **fungilor** (drojdii şi mucegaiuri), **recombinarea genetică** în vederea obţinerii de caractere noi, se face prin procese de sexualitate adevăratã sau de sexualitate primitivă, numite procese parasexuale. Importanţa ciclului parasexual constă în aceea că el este larg răspândit la fungii cu importanţă industrială ca *Aspergillus sp.* şi *Penicillium sp.* De aceea, recombinarea parasexuală poate fi folosită cu succes la aceşti fungi pentru obţinerea de tulpini cu caractere noi, utilizabile în producţia industrială. În ultimii ani, **fuziunea de protoplaşti** a fost aplicată cu succes în realizarea hibrizilor somatici la drojdii de interes economic. Întrucât marea majoritate a drojdiilor folosite în industrie sunt diploide sau poliploide, sunt mai greu de marcat cu markeri de auxotrofie şi de aceea, se preferă introducerea markerilor mitocondriali. S-au obţinut astfel mutante rezistente la antibiotice sau la diferite metale grele şi mutante *petite*. Prin fuziune de protoplaşti se poate obţine ameliorarea drojdiilor tradiţionale. De exemplu, prin fuziune de protoplaşti între *Saccharomyces carlsbergensis* care nu fermentează dextrina şi *Saccharomyces diastaticus* care fermentează dextrina, se poate obţine un hibrid care se poate folosi la fabricarea uneri beri cu conţinut scăzut de glucide.

2.2 Principii de conservare a microorganismelor folosite în industrie.

Deşi, în principiu, este posibil totdeauna de a izola un mare număr de microorganisme din natură, dezvoltarea microbiologiei industriale a făcut necesară conservarea tulpinilor pure selecţionate, astfel încât să-şi menţină proprietăţile de formare a produsului final cu cel mai înalt randament. Metoda clasică de conservare, prin **pasaje succesive** (transfer serial) pe medii de cultură, antrenează variaţii mai mult sau mai puţin importante a caracterelor genotipului (pierderea puterii producătoare, modificarea caracterelor morfologice, apariţia sau dispariţia unor organite). Acest lucru prezintă un inconvenient enorm din punct de vedere industrial, motiv pentru care, această metodă a fost abandonată în microbiologia industrială. Ea mai este folosită totuşi pentru conservarea fungilor, folosind pasaje pe medii naturale, cu specificarea că, la fiecare pasaj, e necesară varierea formulei mediului nutritiv, utilizând mai ales, medii pe bază de morcov, cartof, must de malţ agarizat. Pentru evitarea pierderii apei din mediu şi păstrarea îndelungată a viabilităţii fungilor este recomandată parafinarea dopului de vată. În aceste condiţii,culturile fungice pot fi păstrate la temperatura de +4 - 5°C timp de 2 - 3 ani, fără să-şi piardă viabilitatea.

De asemenea, pentru multe alge transferul serial este unica tehnică de conservare dovedită, până in prezent, a avea eficienţă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Metodele de conservare cele mai folosite în prezent pentru microorganismele industriale sunt:

1. Conservarea sub ulei de parafină se aplică unui număr mare de bacterii, levuri, alge şi protozoare. În acest scop, culturile microbiene obţinute în faza de creştere logaritmică pentru microorganismele nesporulate şi în fază sporulată abundent pentru cele sporulate sunt acoperite de un strat de ulei de parafină steril, de aproximativ 10 mm grosime. Prezenţa uleiului evită evaporarea apei, ceea ce împiedică orice variaţie în concentraţia substanţelor dizolvate şi deci, orice variaţie de presiune osmotică, primejdioasă pentru viaţa microorganismelor. Culturile astfel tratate pot fi păstrate la frigider la +4° - 5°C timp de mai mulţi ani, fără a-şi pierde proprietăţile biochimice. Această metodă este mai adecvată decât liofilizarea pentru conservarea tulpinilor nesporulate.

2. Liofilizarea (criodesicarea) constă în răcirea rapidă la –70°C a unui mic volum de suspensie microbiană, plasat într-un tub de sticlă cu diametru mic, urmată de uscarea sub vid de 1/20mm Hg şi închiderea tuburilor sub vid. Metoda se aplică tuturor microorganismelor şi prezintă numeroase avantaje: distrugerea proteinelor şi a enzimelor microorganismelor este redusa la minimum din cauza rapidităţii uscării, iar concentrarea de substanţe indezirabile din soluţie este evitată prin această refrigerare rapidă. De asemenea, folosirea unui vid avansat privează de oxigen atmosfera tubului. Pentru a mări şansele de supravieţuire a microorganismelor în cursul operaţiei de liofilizare, se adaugă suspensiei coloizi protectori ca: lapte, ser, peptonă, albuş de ou, glucide. Într-adevăr, în cursul liofilizării un mare număr de microorganisme sunt omorâte, dar proporţia de celule supravieţuitoare, care variază între 5 – 30% din numărul iniţial, permite, după adăugarea de apă fiziologică sterilă liofilizatului, obţinerea unei culturi microbiene care şi-a conservat toate facultăţile de creştere şi toate proprietăţile metabolice. Astfel, experienţele de conservare prin liofilizare a bacteriilor producătoare de aminoacizi au demonstrat o viabilitate de 15 ani, iar pentru *Bacillus subtilis* producător de amilază, o viabilitate de 25 de ani. De asemenea, unele bacterii care conţin plasmide sunt conservate cu succes pein această metodă.

3. Desicarea directă este o metodă de conservare aplicată de un colectiv al Institutului "Dr. Ion Cantacuzino"- Bucureşti la un număr de aproximativ 200 de tulpini de bacterii, drojdii şi mucegaiuri producătoare de enzime. S-au utilizat culturi în vârstă de 48 de ore pentru drojdii şi culturi sporulate pentru bacterii şi mucegaiuri. Suspensiile de microorganisme realizate într-un amestec de 10% zaharoză şi 1% gelatină se supun desicării în vid. Uscarea decurge perfect în recipiente cu dop de vată, păstrând raportul de 1:10 între

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

volumul suspensiei microbiene supuse desicării şi volumul fiolei. Sensibilitatea termică a tulpinilor în cursul desicării impune aplicarea unor scheme de operare diferenţiată pe grupe de microorganisme. Astfel, pentru bacteriile sporulate temperatura de pornire este de 42°C, iar temperatura finală de desicare este de 50°C; pentru drojdii 35°C şi respectiv 40°C iar penrtru mucegaiuri 30°C şi respectiv 38°C. Rehidratarea se face în bulion cu adaus de extract de malţ în proporţie de 0,3%. Procedeul asigură un procent de viabilitate ridicat, superior liofilizării.

4. Crioconservarea. Microorganismele pot fi conservate la –5°C până la –20°C, timp de 1-2 ani, prin înghețarea culturilor în bulion sau a suspensiilor celulare în dispozitive corespunzătoare.

Înghețarea la temperaturi mai joase se face la –70°C sau în azot lichid la –156°C până la 196°C. În ambele cazuri este nevoie de un crioprotector ca glicerolul sau dimetilsulfoxid (DMSO). Se folosesc culturi în bulion în faza logaritmică de creştere (mijlocul sau sfârşitul fazei), care se amestecă cu un volum egal de glicerol 10 – 20% sau DSMO 5-10%. Se pot folosi şi suspensii în bulion steril cu glicerol 10% din culturi crescute pe geloză nutritivă înclinată. În fiecare caz, suspensiile sunt pipetate în fiole criogenice, apoi înghețate şi conservate.

Dacă se foloseşte inghețarea în azot lichid se procedează în felul următor: suspensia microbiană pregătită cum s-a arătat anterior, se repartizează căte 1,5 ml în fiole criogenice de 3 ml, care se supun vidării şi apoi se închid la flacără. Congelarea se face în trei etape: 1) menținere la –12°C, timp de 50 de minute; 2) introducere într-un amestec de vapori de azot şi alcool etilic la –70°C; 3) imersare bruscă în azot lichid la –196°C. Decongelarea se face brusc, prin imersarea fiolelor în baie de apă la 30°C.

Metoda prezintă avantaje similare liofilizării, in sensul că asigură o viabilitate bună, potențial de biosinteză ridicat şi stabilitatea genetică a culturii microbiene respective. S-a aplicat cu succes la conservarea culturilor bacteriene producătoare de aminoacizi.

Până în prezent păstrarea în azot lichid este încă o metodă de conservare cu cel mai mare succes pe termen lung.

5. Conservarea pe sol steril se aplică în special actinomicetelor din genul *Streptomyces* şi mucegaiurilor. Se foloseşte sol de grădină amestecat cu 20% nisip şi 1-2 % carbonat de calciu. Acest amestec, repartizat în tuburi mai mari, în cantitate de câteva grame şi umectat cu puţină apă, se sterilizează la autoclav, la 130°C, 2 – 3 ore, de mai multe ori. După răcire, cu o pipetă sterilă, se adaugă o cantitate suficientă din cultura sporulată, care

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

urmează a fi conservată. După evaporarea apei într-un exicator cu vid, tuburile se parafinează şi apoi se pot păstra astfel timp de 20 de ani, fără pierderea proprietăţilor metabolice.

Nu există o metodă de conservare eficientă universal, ci diferite metode care sunt adecvate caracterelor specifice ale unui anume microorganism, iar aplicarea lor adecvată necesită experienţa specialistului.

Din acest motiv, testarea capacităţii productive a microorganismelor păstrate mai mult timp este obligatorie înainte de iniţierea unui proces microbiologic industrial, pentru a verifica dacă microorganismul respectiv şi-a păstrat întreagă capacitatea de a produce substanţa care ne interesează. În acest scop, se realizează un proces microbiologic în laborator, în condiţii standard şi se măsoară produsul format, prin extragerea lui aseptică din mediul de cultură la intervale de timp stabilite.

3. Condiţiile necesare realizării unui proces microbiologic industrial

Condiţiile necesare realizării unui proces microbiologic industrial reprezintă în esenţă acei factori care influenţează cantitatea de produs final care ne interesează. Aceştia sunt: compoziţia mediului de cultură, temperatura, pH, aerarea, agitarea şi asepsia.

3.1 Compoziţia mediului de cultură

Aceasta variază pentru fiecare microorganism deoarece, fiecare posedă exigenţe nutritive speciale. Totuşi, orice mediu de cultură, trebuie să conţină în general: o sursă de carbon şi energie, o sursă de azot, elemente minerale şi adesea, factori de creştere, care sunt vitaminele din grupul B.

Sursa de carbon este reprezentată de glucide. În mediile de cultură industriale, mai rar se folosesc glucide pure deoarece sunt scumpe. Se preferă deşeuri ale diferitelor industrii, care conţin glucidele respective şi care sunt mult mai ieftine. Asemenea surse sunt reprezentate de: orz, făina de ovăz, secară, soia şi alune care conţin amidon; melasă de sfeclă şi trestie, care conţine zaharoză; hidrolizat de amidon care conţine glucoză; pudră de zer care conţine lactoză. Trebuie precizat şi faptul că în ceea ce priveşte melasa, exista deosebiri privind conţinutul cantitativ si calitativ de glucide între melasa de sfeclă şi cea de trestie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Astfel. melasa de sfeclă conţine 48,5% zaharoză, 1% zahăr invertit şi 1% rafinoză; melasa de trestie conţine mai puţină zaharoză (33,4%), mai mult zahăr invertit (15 - 25%) şi nu conţine rafinoză.

Sursa de azot este reprezentată de azot mineral, sub forma de săruri de amoniu sau nitraţi sau/şi azot organic sub formă de hidrolizate proteice de natură animală sau vegetala ca: peptone, extract de carne, făină de soia, făina de alune, pudră de zer, *corn-steep*, făină de orez, făină de secară, melasă de sfeclă şi de trestie, farmamedia.

Corn-steep este un extract lichid de porumb, cu pH acid, care conţine substaţe azotate (peptone şi aminoacizi), polizaharide complexe asemănătoare gumelor, cantităţi variabile de zaharuri reducătoare, acid lactic, săruri minerale şi vitamine din grupul B.

Farmamedia (pharmamedia) este o pudră galbenă obţinută din embrionul seminţelor de bumbac, folosită industrial în mediile de producere a tetraciclinei şi a noilor peniciline. Conţine 56% proteine, 24% glucide, 5% ulei şi 5% săruri minerale (calciu, fier, cloruri, fosfat, sulfat).

Factorii de creştere sunt aduşi de extractul de drojdie, extractul de ficat sau reziduurile de la distilarea alcoolului (*distillers solubles)*. Acestea din urmă sunt bogate în proteine şi vitamine din grupul B.

Elementele minerale sunt adăugate mediului sub formă de soluţii de săruri minerale sau organice, mai mult sau mai puţin complexe, deşi apa de robinet le aduce în cantitate suficientă pentru creşterea majorităţii microorganismelor utilizate în industrie.

Uleiurile vegetale, sau minerale. În afara substanţelor enumerate mai înainte ca absolut necesare, în mediile de cultură industriale se adaugă totdeauna uleiuri vegetale, sau minerale.

Uleiurile vegetale sunt de trei categorii după gradul de nesaturare: • tipul **oleic** sau **nesicativ** include uleiurile de măsline şi de alune care conţin în special acid oleic; • tipul **linoleic** sau **semisicativ** include uleiurile de porumb, floarea-soarelui şi seminţe de bumbac. Acestea conţin o cantitate mare de acid gras dublu nesaturat, acid linoleic ($C_{18}H_{32}O_2$); • tipul **linolenic** sau **sicativ** include uleiurile de soia şi seminţe de in. Acestea conţin în cantitate mare un acid gras cu trei duble legături, acid linolenic ($C_{18}H_{30}O_2$). Sicativitatea acestor uleiuri este un rezultat al oxidării componentelor nesaturate în urma expunerii la aer.

Uleiurile vegetale joacă un dublu rol în industria microbiologică: ele pot fi folosite atât ca antispumanţi, fiind agenţi tensioactivi, cât şi ca sursă nutritivă de carbon.

Uleiurile minerale, de obicei hidrocarburi cu greutate moleculară mare, se folosesc numai ca antispumanţi, ele nefiind metabolizate de microorganisme.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3.2 Temperatura

Fiecare microorganism necesitã pentru creşterea sa optimã o anumitã temperaturã. Pentru bacterii, aceasta este cuprinsã între 30° - 37°C, iar pentru fungi între 28° - 30°C. Unele bacterii termofile, ca *Lactobacillus delbrueckii*, utilizat la producerea acidului lactic, necesitã o temperaturã de 55° - 60°C, ceea ce, din punct de vedere industrial prezintã un avantaj important, deoarece evitã în mod automat contaminarea cu alte microorganisme, care nu suportã aceastã temperaturã.

Uneori, în industrie, microorganismele se supun la douã temperaturi diferite pentru a obţine un randament optim. De exemplu, la producerea penicilinei, prima fazã care corespunde creşterii microorganismului, se desfăşoarã la o temperaturã mai joasã, decât faza a doua, în care se formează antibioticul. La producerea de acid citric lucrurile se petrec invers: prima fazã, corespunzãtoare creşterii microorganismului are loc la o temperaturã mai ridicatã decât faza a doua în care se produce acidul citric.

În consecinţã, este esenţială pentru industria microbiologicã construirea unor instalaţii care sã permitã reglarea temperaturii foarte precis, stabil şi în mod continuu. Menţinerea constantã a temperaturii se realizează cu ajutorul unui curent de apã mai mult sau mai puţin încălzitã sau rãcitã, care circulã într-un dispozitiv cu pereţii dubli, sau într-un schimbător de cãldurã, de lungime convenabilã, plasat la exteriorul sau în interiorul bioreactorului.

3.3 Valoarea pH

Fiecare microorganism necesitã pentru creştere un pH determinat, bacteriile în jur de 7,0, fungii în jur de 4,5. Deoarece în cursul majoritãţii proceselor microbiologice se formează CO_2 şi acizi organici care acidificã progresiv mediul de culturã şi împiedicã dezvoltarea microorganismelor, este deosebit de importantã mãsurarea şi ajustarea indicelui pH la o valoare convenabilã. Se folosesc în acest scop:

Substanţe tampon ca fosfaţii sau carbonatul de calciu, acesta din urmã larg utilizat în industriile microbiologice. Substanţele tampon sunt folosite, în general, în exces şi sunt introduse în mediul de culturã de la începutul procesului. Efectul carbonatului de calciu nu se explicã numai prin acţiunea alcalinizantã. S-a constat de exemplu, cã la producerea penicilinei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

prezenţa carbonatului de calciu în mediu determină un randament crescut, dar acelaşi efect nu se obţine dacă este substituit cu NaOH sau KOH. Acelaşi lucru s-a constatat şi în cazul fermentaţiei butirice ca şi al producerii de valină de către bacterii.

Lipsa carbonatului de calciu din mediu sau înlocuirea lui cu alţi agenţi neutralizanţi ca NaOH, Na_2CO_3, determină scăderea considerabilă a producerii de acid butiric şi respectiv de valină. S-a emis ipoteza că efectul carbonatului de calciu depinde şi de mărimea particulelor componente, deoarece particulele de dimensiuni mici dau un pH excesiv de ridicat, în timp ce particulele de dimensiuni mari, dau un pH convenabil. Este posibilă implicarea unui efect fizic al $CaCO_3$, în sensul că microorganismele se adsorb pe suprafaţa particuleleor de $CaCO_3$ şi în aceste condiţii activităţile lor metabolice decurg altfel decât într-un mediu lichid simplu, neutralizat tot cu un agent lichid.

Agenţi neutralizanţi: HCl, NaOH, NH_4OH, ultimul putând servi şi ca sursă de azot. Adăugarea agenţilor neutralizanţi sub formă lichidă se face în cursul procesului microbiologic, prin intermediul aparatelor de control automat al valorii pH.

3.4 Aerarea

Pentru fermentaţiile propriu-zise, adică pentru procesele anaerobe, nu se pune problema aerării, ci dimpotrivă, trebuie create condiţiile cele mai bune pentru împiedicarea pătrunderii aerului în vasul de fermentaţie. Crearea condiţiilor de anaerobioză se face prin folosirea unor vase mari, în care, mediul de cultură se află într-un strat gros, astfel încât chiar în cazul fermentaţiei deschise, aerul să nu pătrundă în profunzimea mediului (fabricarea berii, vinificaţia). În plus, CO_2 care ia naştere în fermentaţia alcoolică creiază prin el însuşi condiţii de anaerobioză.

În cazul fermentaţiilor închise (butirică, acetono-butilică), se introduce în vasul de fermentaţie, la începutul procesului, CO_2, care uşurează începutul fermentaţiei. Mai târziu, se poate deschide vasul de fermentaţie, deoarece gazele formate (CO_2 + H_2) realizează o atmosferă lipsită de oxigen.

Problema aerării se pune pentru procesele aerobe. În acest caz, există două metode de cultivare:

1. cultivare in suprafaţă, în care aerarea se asigură prin cultivarea microorganismelor la suprafaţa mediului din vasele de cultură. Pentru asigurarea unei aerari cât mai bune, mediul de cultură se repartizează în strat subţire în vase de capacitate mare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. cultivare submersă, în care aerarea se asigură prin introducerea în vasul de cultură a aerului steril, sub o presiune uşor superioară presiunii atmosferice, cu ajutorul unor dispozitive speciale de aerare. În acest ultim caz se pun două probleme:

1. sterilizarea aerului folosit la aerarea culturilor. Cea mai eficientă şi deci cea mai utilizată metodă de sterilizare a aerului este filtrarea. Materialele filtrante folosite în industria microbiologică sunt: fibre de sticlă sau hârtie îmbibată cu răşini având diametrul porilor mai mic de 5 μm sau răşini polivinilice de porozităţi diferite.

2. crearea în mediu a unei concentraţii de oxigen dizolvat, convenabilă pentru creşterea microorganismului. După cum se ştie, oxigenul are o solubilitate în apă foarte redusă. De aceea, cantitatea de oxigen dizolvat trebuie să fie în orice punct al mediului şi în orice moment superioară valorii critice, sub care se constată tulburări metabolice care antrenează moartea celulei. Această valoare critică variază între 0,003 şi 0,009 mmoli/litru mediu/oră.

Totuşi este nevoie să cunoaştem nevoia de oxigen maximă a unui microorganism, deoarece aceasta condiţioneaza productivitatea. Nevoia maximă de oxigen este egală cu $Q_{O_2}C$, în care:

Q_{O_2} = coeficientul de absorbţie al oxigenului exprimat în mmoli/litru de mediu/oră;

C = concentraţia celulară.

Nevoia maximă de oxigen poate varia în cursul cultivării, depinzând de următorii factori: vârsta culturii, stadiul de creştere, concentraţia celulară, producerea anumitor metaboliţi, variaţia compozitiei substratului, prezenţa miceliului. Producerea miceliului în special, măreşte vâscozitatea aparentă a mediului de cultură şi afectează considerabil valoarea vitezei de absorbţie a oxigenului. Alt factor care diminuează mult valoarea coeficientului de absorbţie al oxigenului sunt substanţele tensioactive, care prin agitare antrenează formarea de spumă.

Ţinând seama de cele menţionate, introducerea aerului steril în culturile submerse se face folosind dispozitive speciale, care-l introduc sub formă de bule şi apoi, prin agitare, aceste bule de aer sunt divizate mai mult, pentru a mari suprafaţa de contact cu mediul şi deci, posibilitatea dizolvării oxigenului. Adăugarea substanţelor antispumante este de asemenea necesară.

3.5 Agitarea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cazul fermentaţiilor propriu-zise agitarea nu este necesară, deoarece ele se efectuează în absenţa aerului, iar gazele care iau naştere, în special CO_2, asigură de la sine o agitare, necesară pentru a mări viteza de schimb între microorganisme şi mediul de cultură. În cazul proceselor aerobe, **cultivarea în suprafaţă** nu necesită agitare; **cultivarea submersă** însă necesită în mod obligatoriu agitare, pentru a asigura uniformitatea suspensiei microbiene, pentru a accelera viteza de schimb între microorganisme şi mediul nutritiv şi mai ales, pentru a diviza bulele de aer, mărind suprafaţa lor de contact cu mediul.

Există două modalităţi de agitare:

1. Pentru cultivarea în laborator, mediul de cultură se repartizează în flacoane Erlenmeyer, in strat subţire (1/5 din capacitatea vasului) şi se aşează pe un agitator sau *shaker*. Există, în principal, trei tipuri de agitatoare de laborator:

- agitatorul alternativ (*reciprocating shaker*);
- agitatorul rotativ (*rotating shaker*);
- agitatorul basculant (*tilting shaker*). -

Cele mai bune rezultate le dă agitatorul rotativ care este folosit în exclusivitate, datorită robusteţii sale şi capacităţii de oxigenare mai ridicate. Agitatoarele sunt plasate în spaţii termostatate, sau sunt prevăzute cu dispozitive proprii de termoreglare, pentru menţinerea temperaturii de incubare la valoarea dorită.

Măsurarea vitezei de absorbţie a oxigenului se face după **metoda Cooper**. În acest scop, mediul de cultură din Erlenmeyer este înlocuit cu acelaşi volum de soluţie de sulfit de sodiu 0,5M, conţinând urme de săruri de cupru sau cobalt. În prezenţa oxigenului dizolvat, sulfitul de sodiu se oxidează rapid, ionii de cupru servind drept catalizatori. Pentru a evidenţia aceasta oxidare şi deci, cantitatea de oxigen absorbită, se iau în decurs de 20 de minute, probe la anumite intervale de timp care se tratează cu un exces de soluţie de iod 1N şi se titrează cu o soluţie de tiosulfat de sodiu 1N.

2. Pentru cultivarea în staţiile pilot şi în industrie mediul de cultură se află în nişte aparate numite bioreactoare (fermentatoare, după o denumire mai veche) prevăzute cu dispozitive speciale de agitare, care însoţesc în mod obligatoriu dispozitivele de aerare. Acestea sunt în esenţă constituite dintr-un arbore fixat în axul bioreactorului, animat de o mişcare de rotaţie şi purtând una sau mai multe turbine de agitare. Tipurile de agitatoare folosite în industriile microbiologice sunt: **turbine** sau **discuri cu palete**, **elice**. Cele mai folosite în prezent sunt turbinele cu palete.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În acest caz nu se mai poate folosi metoda Cooper pentru măsurarea cantităţii de oxigen dizolvat, ci se folosesc electrozi special construiţi care măsoară potenţiometric cantitatea de oxigen dizolvat.

3.6 Asepsia

Asigurarea condiţiilor de sterilitate riguroasă pe tot parcursul procesului microbiologic industrial este obligatorie pentru calitatea procesului final. Trebuie respectate condiţiile de lucru steril atât în operatiile de însămânţare în laborator, cât şi în cele de transferare a inoculului din laborator în bioreactoarele industriale, la introducerea diferitelor lichide în bioreactoare sau la prelevarea de probe. O sursă de infecţie o constituie sterilizarea incorectă a mediului de cultură sau a aerului folosit la aerarea culturilor submerse.

Pentru sterilizarea mediilor de cultură se aplică sterilizarea în vapori de apă sub presiune după două procedee:

- injectarea de vapori de apă direct in mediu, ceea ce obligă să se ţină cont de volumul apei condensate astfel, în constituţia formulei finale a mediului de cultură;
- încălzirea cuvei şi a continutului său la temperatura corespunzătoare cu ajutorul vaporilor de apă care circulă într-o serpentină sau într-un perete dublu.

Aceste procedee de sterilizare antreneaza o mare pierdere de timp. Astfel, pentru cuve de 20 – 200 m^3, atingerea temperaturii de 121°C necesită mai multe ore. După menţinerea mediului la această temperatură cel puţin 20 de minute, răcirea la temperatura de însămânţare necesită tot atâta timp cât pentru încălzire. Alt inconvenient este acela că, menţinerea mediilor de cultură la această temperatură o perioadă de timp mai lungă antrenează o distrugere a unor constituienţi nutritivi. Acesta este motivul pentru care, instalaţiile moderne utilizează aparate de sterilizare continuă cu structură tubulară, în care mediul de cultură este sterilizat şi răcit la o temperatură convenabilă într-un mod foarte rapid.

Prin aceasta se realizează o mare economie de timp, se conservă mai bine proprietăţile nutritive ale mediului datorită diminuării perioadei de contact cu căldura şi se realizează o uniformitate a mediilor astfel sterilizate.

În ceea ce priveşte aerul introdus pentru aerarea culturilor, sterilizarea acestuia se face de obicei prin filtrare, filtrele respective fiind în prealabil sterilizate tot prin căldură.

Alte procedee de sterilizare folosite în industria microbiologică sunt:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- utilizarea unor substanţe chimice ca: halogeni, compuşi fenolici, apa oxigenată, oxid de etilenă si formaldehidă. Aceste substanţe sunt folosite pentru dezinfectarea diferitelor instrumente, aparaturii şi a spaţiilor respective.
- radiaţiile electromagnetice (radiaţiile U.V.) şi radiaţiile ionizante (radiaţiile γ) sunt folosite la sterilizarea spaţiilor laboratoarelor (radiaţiile U.V.) sau a unor instrumente (radiaţiile γ).

4. Etapele necesare realizării unui proces microbiologic industrial

Realizarea unui proces microbiologic industrial se face în patru etape:

1) etapa de laborator;
2) etapa de staţie pilot;
3) etapa de producţie industrială;
4) etapa de separare a produsului final.

4.1 Etapa de laborator

Etapa de laborator este importantă pentru că în laborator se realizează:

- selecţionarea microorganismelor înalt productive;
- studii de creştere şi producţie a microorganismului selecţionat, înainte de a trece la producţia pe scară industirală;
- conservarea microorganismelor selecţionate cu păstrarea capacităţii lor productive;
- pregătirea inoculului pentru staţia pilot sau pentru industrie.

În laborator, microorganismele se pot cultiva în mai multe moduri:

- pe medii solide sau semi-solide cu agar;
- pe medii lichide, în baloane Erlenmeyer, plasate pe un agitator, cele mai bune agitatoare fiind cele rotative;
- în bioreactoare de laborator, cu un volum de 20 de litri, prevăzute cu dispozitive speciale de termoreglare, ajustarea valorii pH, aerare şi agitare.

În ceea ce priveşte pregătirea inoculului, acesta se obţine pe acelaşi mediu şi în aceleaşi condiţii cu cele utilizate în etapele următoare. **Inoculul** poate fi **vegetativ**, reprezentat de celule în faza de creştere logaritmică sau **sporulat**, reprezentat de o cultură complet sporulată.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pregătirea inoculului se face în felul următor: plecând de la cultura microorganismului selecţionat se face o trecere pe mediu solidificat înclinat. După 12 – 13h se face din cultura obţinută o suspensie în apă fiziologică sterilă, cu care se însămânţează un mediu de cultură aflat în flacoane Erlenmeyer. După o durată de creştere optimă, pe un agitator rotativ, conţinutul acestor Erlenmeyere este utilizat pentru însămânţarea unui bioreactor de laborator, obţinându-se astfel **inoculul de laborator**. Toate operaţiunile de însămânţare, ca şi celelalte operaţiuni se fac în condiţii absolut sterile, într-o cameră sau într-o nişă sterilă. Acestea sunt prevazute cu lămpi bactericide de U.V. (λ= 253,7 nm) care se pun în funcţiune înainte de începerea lucrului şi se scot din funcţiune în timpul lucrului.

4.2 Etapa de staţie pilot

Este absolut obligatorie în iniţierea unui proces microbiologic industrial. În această etapă, tehnologia elaborată la nivel de laborator este verificată în instalaţii de biosinteză având capacităţi mai mari. Se realizează în acest mod, un anumit proces microbiologic la scară redusă, asigurându-se aceleaşi condiţii şi aceiaşi parametri folosiţi la producţia pe scară industrială. Se folosesc bioreactoare pilot de circa 100 – 1000 litri capacitate, care permit studiul sistematic al celor mai bune condiţii pentru producţia industrială.

4.3 Etapa de producţie industrială

Începe cu obţinerea **inoculului industrial**. Pentru aceasta, inoculul de laborator este folosit pentru a însămânţa unul sau mai multe bioreactoare de 50 - 1000 l, obţinându-se inoculul industrial. Acesta va servi pentru inocularea bioreactoarelor industriale de 50 - 100 m^3 capacitate.

Bioreactoarele (fermentatoarele) industriale sunt nişte vase închise, de formă cilindrică, din oţel inoxidabil. La partea superioară se află numeroase conducte prin care este adus aerul steril, este scos aerul plus gazele rezultate, prin care se introduce inoculul şi se iau probe, se adaugă produşi antispumanţi sau diferiţi reactivi. Tot la partea superioară se află aparatele de control: electrozi pentru măsurarea indicelui pH, electrozi pentru măsurarea cantităţii de oxigen dizolvat, un termometru şi un manometru.

În interiorul bioreactorului se află dispozitivele de aerare şi agitare. La partea inferioară bioreactorul este prevăzut cu un tub de vid, cu diametru mare, care permite evacuarea culturii microbiene. Deoarece sterilizarea mediului şi îndepărtarea căldurii sunt vitale pentru succesul procesului industrial, bioreactorul este prevăzut cu un înveliş extern

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

prin care circulã vapori de apã pentru sterilizarea mediului sau apă rece pentru îndepărtarea căldurii.

Bioreactoarele care funcţionează în condiţii de anaerobiozã sunt construite la fel, cu deosebirea cã nu necesitã dispozitive de aerare şi agitare.

4.4 Separarea produşilor finali

Prima operaţie după terminarea procesului industrial este separarea corpilor microbieni, care se face prin filtrare sau centrifugare. Dacã produsele activităţii microbiene s-au acumulat în mediu, atunci, lichidul de culturã se supune prelucrării. Dacã substanţele care ne interesează sunt constituenţi ai celulei microbiene, este necesară dezintegrarea mecanică a celulei microbiene,de obicei cu ultrasunete, după care, urmează separarea de resturile celulare prin filtrare, sau centrifugare, iar lichidul obţinut este supus prelucrării. Metodele folosite în acest scop sunt:

- extracţia cu solvenţi organici: alcooli (butanol, propanol, izopropanol); esteri (acetat de etil, de butil şi de amil); cetone (metiletilcetonã, metilbutilcetonã); eteri (eter izopropilic, dioxan); unele hidrocarburi derivate din petrol (benzen, fenol, piridinã, dicloretan, cloroform). Metoda s-a folosit în industria antibioticelor,dar în prezent a scăzut din importanţă datoritã faptului cã aceşti solvenţi sunt scumpi şi adesea inflamabili, ceea ce necesitã recuperarea lor, precum şi precauţii riguroase contra incendiilor.
- precipitarea este o metodã mai simplã şi mai ieftinã, utilizatã la separarea unor antibiotice din grupa tetraciclinelor. Reactivii utilizaţi pentru precipitare sunt: hidroxidul de calciu pentru tetraciclinã sau anumite sãruri de amoniu cuaternar pentru oxitetraciclinã.
- adsorbţia este de asemenea o metodã simplã şi ieftinã, care asigurã în acelaşi timp izolarea, purificarea şi concentrarea produsului respectiv. Metoda se bazează pe adsorbţia pe un adsorbant solid a compusului de separat din soluţia apoasã şi apoi eluţia cu ajutorul unui mic volum dintr-un alt solvent, în condiţii de pH bine precizate. Adsorbanţii folosiţi sunt:

- cãrbune activ, folosit la decolorarea sau adsorbţia compuşilor aromatici;

- oxidul de aluminã şi gelul de silice, utilizaţi la separarea pigmenţilor sau unor steroizi;

- amidonul şi celuloza, utilizaţi uneori pentru separarea aminoacizilor sau a acizilor nucleici;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- răşini schimbătoare de ioni, folosite la separarea aminoacizilor, antibioticelor şi în general a majorităţii produşilor.

5. Clasificarea produşilor microbieni sub aspect fiziologico-metabolic

I Material celular (Biomasă)

Reacţia de bază: **Substrat → Celule microbiene**

De exemplu: proteină unicelulară (*single cell protein*) din celule de bacterii, drojdii şi alge.

II Produşi de metabolism

Reacţia de bază: **Substrat → Produs + Celule microbiene**

A Produşi finali ai metabolismului energetic (produşi de fermentatie)

De exemplu: etanol, acetonă, butanol, acid lactic, acid propionic, acid butiric, 2-3 butandiol, izopropanol.

B Metaboliţi primari

De exemplu: aminoacizi, vitamine, nucleotide, acid citric.

C Metaboliţi secundari

De exemplu: antibiotice, alcaloizi din ergot (cornul secarei), gibereline, micotoxine.

D Enzime

De exemplu: enzime extracelulare ca: amilaze, proteinaze, celulaze şi enzime intracelulare ca: invertaza, penicilinaza.

III) Bioderivaţi (Produşi de bioconversie)

Reactia de bază: **Substrat precursor** $\xrightarrow{\text{Celule microbiene}}$ **Produs**

De exemplu: producerea acidului acetic şi a acidului gluconic prin oxidarea etanolului şi respectiv a glucozei; transformări ale steroizilor cu formarea de hormoni corticosteroizi; oxidarea D- sorbitolului la L-sorboză în procesul obţinerii vitaminei C.

Noţiunile de **metabolit primar** şi **metabolit secundar** sunt legate de cele două faze in care se realizează procesele microbiologice industriale şi anume:

1. **faza de creştere, trofofaza** sau **faza de metabolism primar**, corespunzând perioadei de multiplicare rapidă şi de acumulare de biomasă;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. **faza de producţie, idiofaza** sau **faza de metabolism secundar**, în cursul căreia creşterea celulelor încetează, dar celulele rămân metrabolic active, elaborând diferiţi produşi.

Metaboliţii primari sunt molecule mici de tipul aminoacizilor, acizilor organici, nucleotidelor, vitaminelor, reprezentând produşi intermediari sau finali ai metabolismului intermediar, care sunt folosiţi ca blocuri de construcţie pentru macromoleculele esenţiale sau sunt convertiţi în coenzime. Metaboliţii primari se formează în cursul trofofazei ca rezultat al metabolismului oxidativ sau fermentativ şi sunt esenţiali pentru creşterea şi viaţa celulei microbiene.

Metaboliţii secundari sunt produşi în cursul idiofazei şi sunt substanţe de mare interes practic: antibiotice, alcaloizi din ergot, biostimulatori ai creşterii plantelor de tipul giberelinelor, pigmenţi, toxine, dar nu sunt esenţiali pentru creşterea şi viaţa celulei microbiene. Deosebirea dintre formarea unui metabolit primar şi a unuia secundar este ilustrată în Fig 1. Totuşi, pe baza constatării că unii metaboliţi ca acidul glutamic, acidul citric, vitamina B 12 sunt produşi predominant în idiofază şi nu în trofofază, o serie de cercetători consideră că definiţia metaboliţilor primari sau secundari nu trebuie legată de perioada din ciclul de creştere în care sunt produşi.

Metaboliţii sunt primari pentru că sunt esenţiali pentru creştere şi sunt secundari pentru că nu sunt esenţiali pentru creştere şi în general pentru viaţa celulei microbiene.

Pe de altă parte, trofofaza şi idiofaza nu trebuie să aibă loc în mod obligatoriu în faze diferite in timp, ci uneori pot apărea chiar simultan, aşa cum se întâmplă în condiţii de cultivare continuă in chemostat. Separarea celor două faze în timp este în funcţie de reglarea nutriţională şi nu de tipul de moleculă produs.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

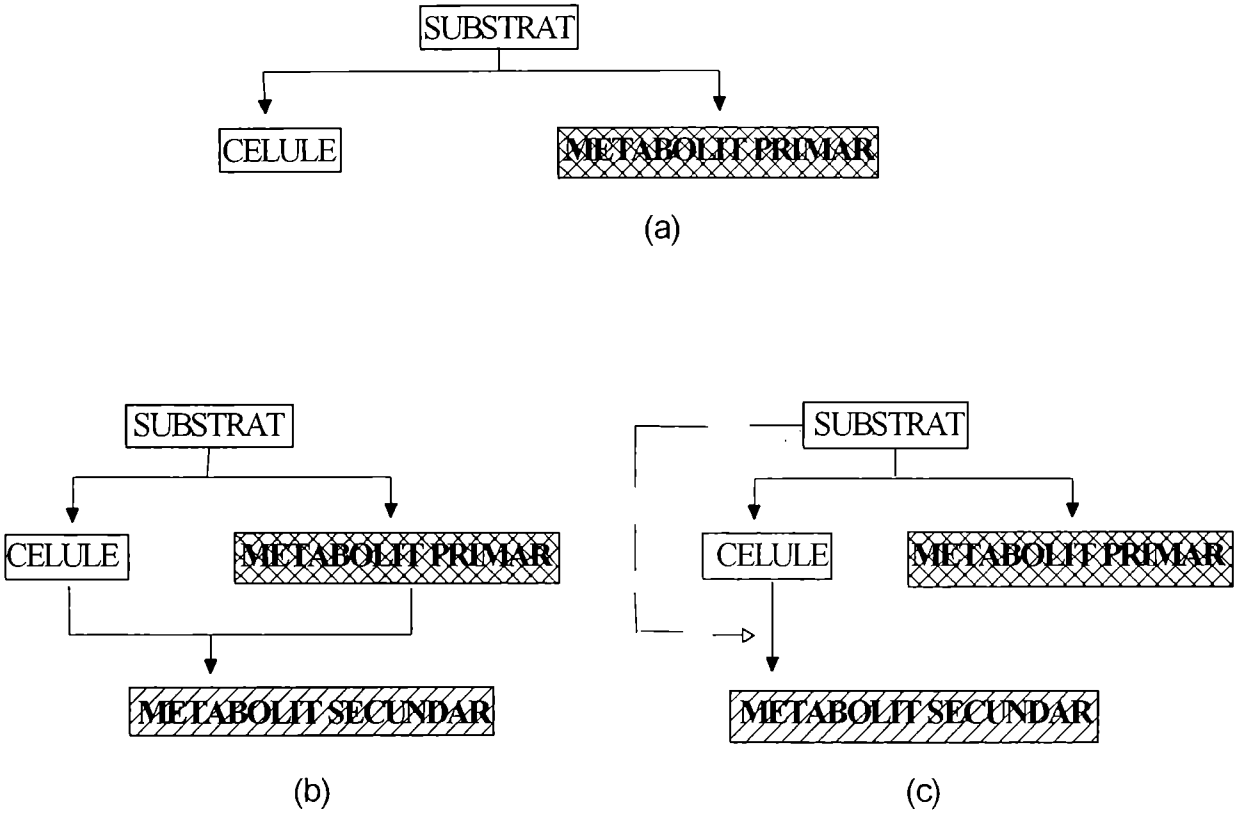


Fig. 1. Formarea metaboliţilor primari şi secundari.

(a) Celulele şi metabolitul primar sunt produşi mai mult sau mai puţin simultan; (b) După ce se produc celulele şi metabolitul primar, celulele produc conversia metabolitului primar în metabolit secundar; (c) După ce s-au format celulele şi metabolitul primar, restul substratului este transformat în metabolit secundar.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL II

PRODUCEREA DE BIOMASĂ, RESPECTIV DE PROTEINĂ DE CĂTRE MICROORGANISME

Deficitul mondial de proteine este o realitate a timpurilor noastre. In condiţiile exploziei demografice, când se estimează că populaţia globului va fi de cel puţin 6,2 miliarde locuitori, deficitul proteic se va accentua, cu toate că, o anumită creştere a proteinelor convenţionale, ca urmare a dezvoltării agriculturii şi zootehniei, este luată în consideraţie. Studii recente au arătat că necesarul de proteine furajere pentru asigurarea unei alimentaţii umane normale este de 100 kg/locuitor, ceea ce înseamnă un necesar mediu de 500 milioane tone proteine furajere anual. În prezent însă, producţia mondială de proteine furajere de origine vegetală sau animală nu depăşeşte 75 mil. tone anual. În această situaţie, restul de 425 mil. tone trebuie asigurat pe alte căi, pentru ca necesarul mondial să fie acoperit. Din acest motiv, preocuparea de prim ordin în prezent, este de a compensa deficitul printr-o producţie de tip nou a alimentelor proteice, descoperind noi surse, altele decât acelea de care omul s-a servit până acum.

În cadrul acestor surse noi de proteine intră:

- surse "semi-convenţionale", care sunt proteinele seminţelor de oleaginoase (soia) şi din concentratele de peşte, utilizate curent astăzi în diferitele ţări ale globului;

- surse "neconvenţionale", care sunt proteinele furnizate de microorganisme: bacterii drojdii, mucegaiuri, alge.

Producerea de proteină microbiană este cunoscută în literatura de specialitate cu termenul generic de S.C.P. (***single cell protein***), termen care vrea să arate, că proteina microbiană respectivă provine în general de la microorganisme unicelulare, cum sunt bacteriile şi drojdiile. Deoarece produsul obţinut, conţine alături de proteine, 25 – 50% substanţe neproteice, se consideră la ora actuală, că este mai corect termenul de S.C.B. (***single cell biomass***), termenul de *single cell protein* urmând a fi folosit numai pentru proteina microbiană pură.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1. Microorganisme utilizate ca sursă de proteină

Folosirea microorganismelor la producerea de proteină oferă numeroase avantaje şi anume:

- au un conţinut ridicat de proteină (30 – 60%) de bună calitate (sub raportul aminoacizilor esenţiali);
- se reproduc foarte rapid;
- cultivarea microorganismelor nu implică existenţa unor suprafeţe mari de teren şi prin aceasta, scoaterea lor din circuitul agricol;
- cultivarea microorganismelor este controlabilă în cele mai stricte condiţii, iar controlul calităţii produsului este stăpânit cu uşurinţă de om;
- prin selecţie şi tehnici de inginerie genetică se pot obţine tulpini microbiene cu proprietăţi adecvate scopului urmărit de om;
- microorganismele pot utiliza, ca sursă organică de carbon, o gamă practic nelimitată de materii prime reziduale de la alte industrii: melase, zer, reziduuri lemnoase, celuloză şi stuf, ape de canal, petrol, gaze naturale, metanol.

Totuşi, selecţionarea microorganismelor în scopul obţinerii de proteină, are în vedere anumite condiţii pe care trebuie să le îndeplinească microorganismele respective, printre care, cele mai importante sunt:

- conţinut ridicat de proteine şi vitamine, iar proteina să aibă un procent ridicat de aminoacizi esenţiali;
- capacitatea de dezvoltare pe substrate disponibile şi ieftine;
- stabilitate în cultură;
- creştere viguroasă şi producere de biomasă în cantitate mare;
- rezistenţă la contaminanţi şi produşi toxici;
- separare uşoară de mediul de cultură;
- gust acceptabil şi digestibilitate uşoară.

Microorganismle utilizate ca sursă de proteină sunt bacteriile, drojdiile (levurile), mucegaiurile şi algele.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1.1 Bacteriile au un conținut mare de proteină: 47 – 87% şi vitamine din grupul B. Proteina este de bună calitate, având un conţinut ridicat de lizină şi un conţinut bun de metionină şi triptofan (Tabelul 2).

Cele mai utilizate sunt bacteriile strict aerobe nesporulate din genurile: *Pseudomonas, Micrococcus, Corynebacterium, Klebsiella, Arthrobacter, Brevibacterium, Mycobacterium, Methylomonas, Methylophilus, Methylococcus*; bacteriile celulozolitice din genul *Cellulomonas*; cianobacteriile din genurile: *Nostoc, Oscillatoria, Spirulina.*

Tabelul 2. Conţinutul în aminoacizi esenţiali ai proteinelor din bacterii şi drojdii, comparativ cu alte proteine (în g/100g proteină)

Aminoacidul	Proteina F.A.O.	Făină de soia	Făină de peşte	Proteină din drojdii	Proteină din bacterii
Cistină	2,0	1,4	1,0	-	0,6
Fenilalanină	2,8	5,1	4,0	3,7	2,9
Izoleucină	4,2	5,4	4,6	3,6	3,6
Leucină	4,8	7,7 -	7,3	5,9	5,6
Lizină	4,2	6,5	7,0	7,0	6,5
Metionină	2,8	1,4	2,6	1,2	2,0
Treonină	2,8	4,0	4,2	3,9	4,0
Triptofan	1,4	1,5	1,2	0,5	0,9
Valină	4,2	5,0	5,2	4,0	4,5

Bacteriile oferă avantajul unei rate de creştere mai rapidă şi unui conţinut mai mare de triptofan şi de aminoacizi cu sulf, dar prezintă în schimb, dezavantajul unui conținut mare de acizi nucleici (10 – 20%), care pot produce perturbări în metabolismul acidului uric în organismul animal, precum şi costul ridicat al separării celulelor de mediu, datorită dimensiunilor celulare mici.

1.2 Drojdiile (levurile) au un conţinut de proteină de 46 – 56%. Proteina drojdiilor are un conţinut mare de lizină, dar ceva mai scăzut de metionină şi triptofan (tabelul 2). In afară de proteine, drojdiile sunt bogate in vitamine din grupul B, ergosterol şi alte substanţe biologic active. Sunt utilizate drojdiile din genurile: *Candida, Torulopsis, Pichia.* Cea mai importantă din punct de vedere industrial şi cea mai utilizată este *Candida utilis.* Spre deosebire de bacterii, drojdiile au avantajul unei separări mai uşoare de mediu, datorită dimensiunilor celulare mai mari şi au un conţinut mai redus de acizi nucleici (5 – 10%).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1.3 Mucegaiurile conţin 20 – 40% proteine. Ca şi in cazul drojdiilor, conţinutul în metionină şi triptofan este mai scăzut: conţinutul în lizină şi alţi aminoacizi esenţiali este bun. De asemenea, mucegaiurile conţin pe lângă proteine, vitamine din grupul B. Cele mai folosite sunt genurile: *Rhizopus, Penicillium, Fusarium.*

Folosirea mucegaiurilor ca sursă de proteine prezintă o serie de avantaje faţă de celelalte microorganisme datorită:

- structurii lor filamentoase, care permite o separare uşoară de mediu şi asigură totodată proprietăţi fizice specifice, în special de realizare a unor produse structurate, fără a fi necesare eforturi deosebite;
- conţinutului lor în acizi nucleici mult mai mic comparativ cu al bacteriilor şi drojdiilor.

1.4 Algele au un conţinut proteic de 40 - 65%. Proteina algelor este mai săracă în izoleucină şi metionină, dar conţinutul celorlalţi aminoacizi esenţiali este bun. Se folosesc alge verzi cum ar fi: *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* Avantajul pe care-l prezintă algele este determinat de faptul că fiind microorganisme autotrofe, nu este nevoie de o sursă organică de carbon, sursa de carbon fiind reprezentată de CO_2.

2. Materii prime utilizate pentru producerea microbiană de biomasă (respectiv de proteină)

Materia primă, aleasă în funcţie de particularităţile de creştere ale microorganismului, trebuie să fie convenabilă din punct de vedere economic, adică al disponibilităţii şi preţului de cost. De aceea, majoritatea cercetărilor se îndreaptă spre utilizarea materiilor reziduale provenite din diferite industrii, care sunt nu numai avantajoase ca preţ de cost, dar rezolvă şi problema poluării mediului. Aceste materii prime aparţin la patru categorii: glucide, produse petroliere, metan, alcooli.

2.1 Glucide: o serie de deşeuri glucidice ale diverselor industrii pot servi ca materie primă pentru producerea microbiană de biomasă. În această categorie intră:

Melasa şi borhotul de melasă, deşeuri ale fabricilor de zahăr care conţin ca sursă de carbon zaharoză. Pe acestea se dezvoltă în special drojdiile din genul *Candida*: *C. utilis, C. arborea, C. tropicalis* şi mucegaiurile din genul *Fusarium.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Zerul, deşeu al fabricilor de brânzeturi, care conţine ca sursa de carbon lactoză. Pe acesta se dezvoltă drojdii cum ar fi: *Kluyveromyces* (*Saccharomyces*) *fragilis, Candida pseudotropicalis* şi mucegaiuri ca *Penicillium roqueforti, Rhizopus oligosporus*.

Apele reziduale ale fabricilor de amidon care conţin amidon. Pe acestea se dezvoltă drojdiile (*C. utilis*) şi mucegaiurile. În cazul drojdiilor, amidonul trebuie hidrolizat în prealabil cu un preparat enzimatic amilolitic.

Deşeuri celulozice. Folosirea deşeurilor celulozice la producerea de proteină microbiană este de mare importanţă, deoarece celuloza este disponibilă în mare cantitate şi la un preţ de cost mic; totodată se rezolvă în acest mod şi problema poluării mediului înconjurător. Deşeurile celulozice sunt de două categorii:

- deşeuri celulozice ca atare: paie de grâu, coceni de porumb, coji de floarea-soarelui, rumeguş de lemn etc. Pe acestea se dezvoltă fie bacteriile celulozolitice din genul *Cellulomonas*, fie mucegaiurile, ca de exemplu, *Chaetomium cellulolyticum*.
- hidrolizate ale diferitelor deşeuri celulozice: hidrolizate din stuf, hidrolizate ale deşeurilor agricole (coceni de porumb, paie de grâu, coji de floarea-soarelui), leşii sulfitice.

Toate acestea conţin ca sursă de carbon hexoze şi pentoze. Cele mai folosite sunt leşiile sulfitice, deşeu al fabricilor de celuloză. În aceste fabrici există o etapă, în care se îndepărtează lignina şi hemicelulozele care leagă fibrele de celuloză în lemn, prin fierberea bucăţilor de lemn într-un lichid acid, constând din sulfit de calciu sau de sodiu cu exces de SO_2 liber. În timpul fierberii, lignina trece în lignosulfonaţi solubili, iar hemicelulozele sunt hidrolizate în glucide simple (hexoze şi pentoze). Compoziţia leşiei sulfitice obţinute după îndepărtarea fibrelor de celuloză depinde de tipul de lemn folosit. În cazul arborilor cu lemn moale (gimnosperme ca pin, molid), leşia sulfitică obţinută conţine în special manoză, deoarece hemicelulozele respective conţin mai ales manan. În cazul arborilor cu lemn tare (angiosperme ca plop, fag, mesteacăn), leşia sulfitică conţine în special xiloză, deoarece hemicelulozele respective conţin mai ales pentozani, în special xilan. Pe leşii sulfitice şi alte hidrolizate ale deşeurilor celulozice se dezvoltă drojdiile din genul *Candida: C. utilis, C. tropicalis*.

2.2 Produse petroliere ca: petrolul lampant, motorina, ceara de parafină conţin hidrocarburi saturate aciclice (n-alcani sau n-parafine) care pot fi folosite de unele microorganisme ca unică sursă de carbon şi energie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Microorganismele folosesc cu precădere n-alcanii lichizi cu C_{11} - C_{19}; n-alcanii solizi cu C_{20} - C_{40}, existenţi în ceara de parafină, produs secundar obţinut la producerea uleiurilor lubrefiante din petrol, pot fi de asemenea folosiţi dacă sunt dizolvaţi într-un solvent adecvat. Alcanii cu C_2 - C_{10} sunt slab utilizaţi. Motorina şi petrolul lampant se obţin din petrolul brut printr-o simplă distilare. Motorina conţine predominant n-parafine cu C_{14} - C_{16}, iar petrolul lampant n-parafine cu C_{11} - C_{13}. Dacă se folosesc n-parafine pure, ele se separă prin distilare fracţionată din produsele petroliere respective.

Microorganismele capabile să folosească n-alcanii sunt bacteriile din genurile: *Mycobacterium, Corynebacterium, Brevibacterium, Arthrobacter, Pseudomonas, Micrococcus*, drojdiile din genurile: *Candida* (*C. lipolytica, C. zeylanoides*), *Torulopsis* (*T. famata*), *Rhodotorula, Debaromyces* şi mucegaiurile din genurile: *Mucor, Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Cephalosporium*.

2.3 Metanul este un substrat disponibil la un preţ de cost foarte scăzut în unele regiuni ale globului. Fiind un substrat gazos, metanul ridică probleme la construirea bioreactoarelor, dar prezintă în schimb avantajul că nu lasă în produsul finit reziduuri care să pună probleme sub aspect alimentar, ca în cazul parafinelor.

2.4 Alcoolii, în special metanolul şi etanolul pot fi utilizaţi de numeroase microorganisme. Metanolul este o materie primă ideală pentru producţia de proteine, deoarece este perfect miscibil cu apa, metabolizarea lui necesită un consum de oxigen mai redus decât în cazul hidrocarburilor, nu lasă reziduuri în celulă şi poate fi obţinut în stare pură la un preţ relativ scăzut. Aceasta explică de ce, după 1970, a crescut considerabil interesul pentru metanol ca materie primă în producerea de proteină microbiană.

Prin convenţie internaţională, s-a stabilit că toate microorganismele capabile să utilizeze compuşii cu un singur atom de carbon în afara CO_2, adică metanul, metanolul şi metilamina, ca unică sursă de carbon şi energie să poarte denumirea generică de **metilotrofe**. În această categorie intră bacterii şi drojdii (levuri).

Bacteriile metilotrofe sunt Gram-negative, bacilare, nesporulate, strict aerobe, pigmentate în roz sau brun, unele formând capsulă, altele acumulând cantităţi mari de poli-β-hidroxibutirat.

Bacteriile metilotrofe se împart în două grupe:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- obligat metilotrofe care se dezvoltă numai pe metan, metanol şi metilamină. Ele aparţin câtorva genuri şi anume; *Methylomonas, Methylosinus, Methylocystis, Methylococcus, Methylobacter, Methylophilus*. La microscopul electronic s-a evidenţiat la aceste bacterii prezenţa unui sistem membranar intern, bine dezvoltat, derivat din membrana plasmatică şi pe care ar fi localizat sistemul enzimatic implicat în oxidarea metanului şi metanolului.
- facultativ metilotrofe capabile să utilizeze şi alte surse de carbon şi energie în afara metanului, metanolului şi metilaminei. Sunt mai numeroase decât cele din prima grupă şi aparţin unor genuri comune ca: *Pseudomonas, Micrococcus, Corynebacterium, Bacillus, Streptomyces*.

Levurile metilotrofe, spre deosebire de bacteriile metilotrofe sunt toate facultativ metilotrofe. O altă deosebire este aceea că dintre sursele cu un singur atom de carbon, levurile metilotrofe folosesc numai metanolul, nu şi metanul şi metilamina. Fiind facultativ metilotrofe, în afara metanolului, ele pot folosi şi alte surse de carbon şi energie.

Levurile metilotrofe aparţin următoarelor genuri: *Kloeckera, Candida* (*C. boidinii, C. methanolica*), *Pichia* (*P. capsulata*), *Torulopsis* (*T. glabrata*).

3. Metabolismul utilizării alcanilor

3.1 Pătrunderea alcanilor în celula microbiană

Prima etapă în asimilarea alcanilor de către microorganisme este pătrunderea alcanilor în celula microbiană şi transportul acestora către situsul unde va avea loc oxidarea iniţială. Conform cunoştinţelor actuale, adeziunea dintre celulă şi n-alcanii superiori este posibilă numai sub forma de macro- sau microemulsie.

Macroemulsia se produce prin agitarea mecanică şi conţine picături cu diametrul de 1 - 100 μm. Microemulsia constă din picături cu un grad mai mare de dispersare, având diametrul de 0,01 – 0,5 μm şi se formează sub acţiunea unei substanţe produsă chiar de microorganism, cu rol de agent activ de suprafaţă sau surfactant. Aceşti surfactanţi ajută la solubilizarea moleculelor de hidrocarburi (probabil în lipidele membranei plasmatice) şi la trecerea prin membrana plasmatică către situsul de oxidare. S-a stabilit că lipopolizaharidele izolate din pereţii celulari ai microorganismelor care utilizează alcanii, joacă un rol important în procesul de transport al acestora. La drojdii de pildă, acest lipopolizaharid este un manan, care

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

conţine 4% acizi graşi legaţi covalent. Tot la drojdii, studiile de ultrastructură au evidenţiat în peretele celular, prezenţa unor canale, care au structura chimică alterată, ceea ce ar facilita transportul hidrocarburilor.

3.2 Oxidarea iniţială a moleculei de alcan.

Atacul iniţial al hidrocarburii are loc în general la C_1 şi constă din incorporarea oxigenului molecular, cu formarea alcoolului primar, reacţie catalizată de o oxidază cu funcţie de oxigenază (monooxigenază):

$$R\text{-}CH_2\text{-}CH_3 + NADH + H^+ + O_2 \longrightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CH_2OH + NAD^+ + H_2O$$

Levi *et al.* (1979) au formulat trei mecanisme pentru a explica această reacţie: a) o oxidare care implică fie rubredoxina, fie citocromul P-450; b) o hidroperoxidare şi c) o dehidrogenare care nu implică participarea oxigenului.

a) La bacterii, anume, în extractele acelulare de *Pseudomonas oleovorans* s-a pus în evidenţă un sistem de oxidare care implică participarea rubredoxinei (Fig. 2). În acest sistem sunt implicate trei componente: rubredoxina, o reductază $NADH+H^+$ dependentă şi o alcan-1-hidroxilază.

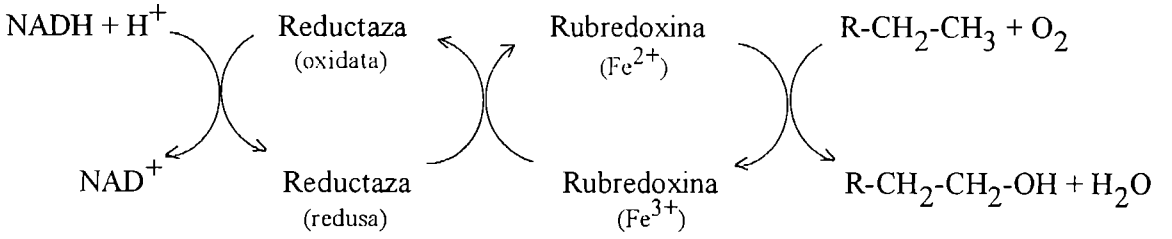


Fig. 2. Sistemul de oxidare a alcanilor la bacterii

La drojdii, anume la *Candida tropicalis*, s-a pus în evidenţă un sistem de oxidare cu participarea citocromului P-450, sistemul citocrom P-450 - hidroxilază, dependent de $NADPH+H^+$ şi localizat în microzomi (Fig. 3).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

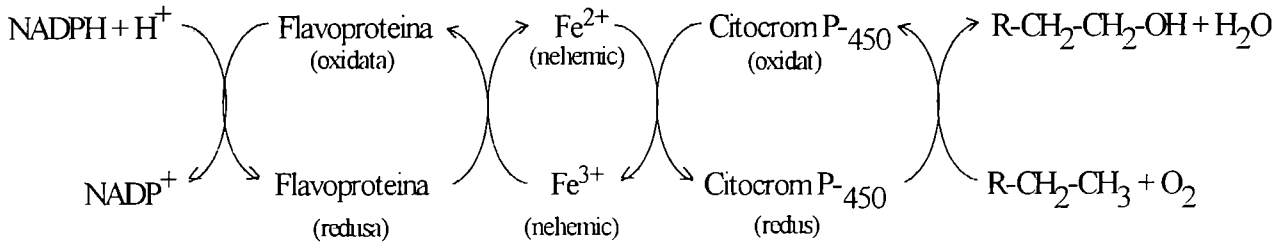
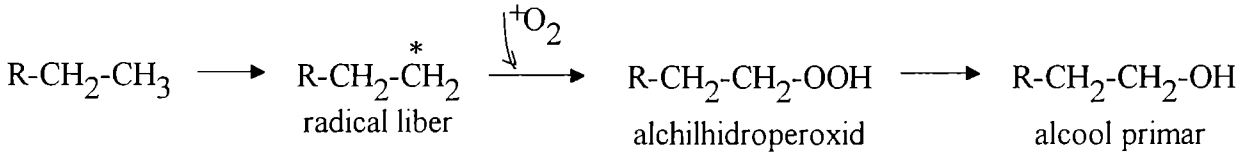


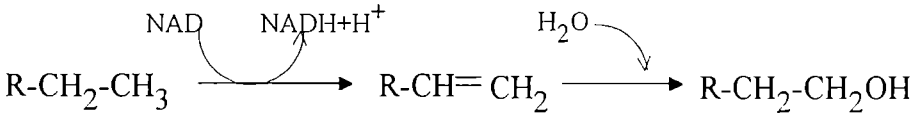
Fig. 3. Sistemul de oxidare a alcanilor la drojdii

b) Acest mecanism presupune formarea de radicali liberi alchil, încorporarea de către aceştia a moleculei de oxigen cu formarea unui alchilhidroperoxid, urmată de transferul unui atom de oxigen la un donor de electroni:



Totuşi există puţine date în literatura de specialitate care să susţină formarea intermediară a unui hidroperoxid în oxidarea alcanilor.

c) Acest mecanism presupune dehidrogenarea la alchene de către o dehidrogenază dependentă de NAD, urmată de adiţia apei cu formarea de alcool:



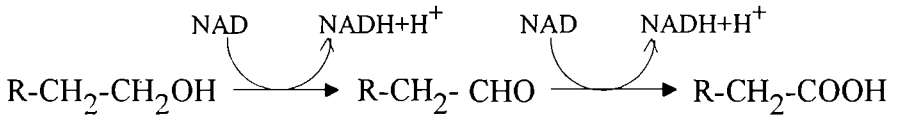
Şi acest mecanism este discutabil, deoarece este greu de susţinut pe baze termodinamice o dehidrogenare anaerobă dependentă de NAD. În concluzie, toate datele experimentale vin în favoarea primului mecanism, cu participarea fie a rubredoxinei, fie a citocromului P-450.

3.3. Metabolizarea ulterioară a moleculei de alcan oxidată

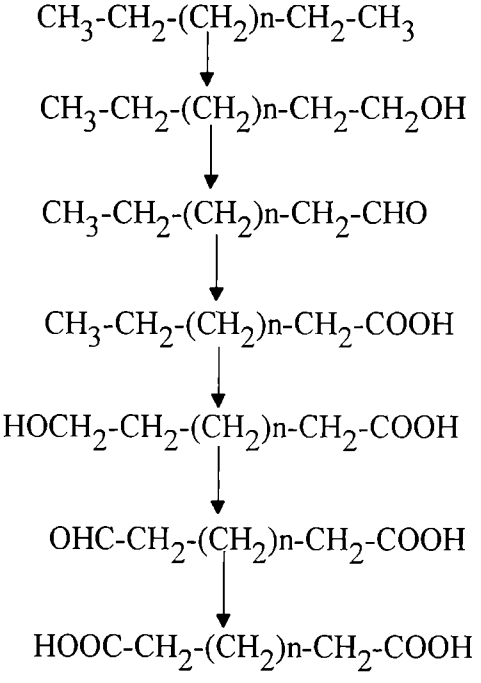
Se cunosc două căi majore de metabolizare: 1. oxidarea terminală şi 2. oxidarea subterminală.

1. **Oxidarea terminală** duce la formarea acidului gras corespunzător, trecând prin stadiul de aldehidă:

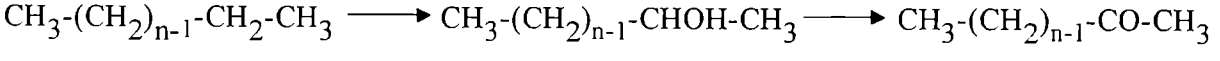
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Acizii graşi formaţi pot fi încorporaţi in lipidele celulei bacteriene sau pot fi oxidaţi mai departe prin β–oxidare, rezultând unităţi cu C_2, care intră in sinteza constituenţilor celulari. Oxidarea terminală poate fi monoterminală, când o singură grupare metil terminală este oxidată la acidul gras corespunzator, aşa cum s-a arătat mai înainte, sau diterminală, când două grupări metil terminale sunt oxidate (oxidare α - ω) cu formarea acidului dicarboxilic corespunzător:



2. **Oxidarea subterminală** are loc în general la atomul de carbon din poziţia 2, dar la unele microorgasnisme poatre avea loc şi la C_3, C_4 sau C_5, cu formarea alcoolului secundar şi în final a cetonei corespunzătoare:



Cercetările făcute pe diferite grupe de microorganisme au stabilit următoarele cu privire la metabolismul alcanilor: bacteriile metabolizează alcanii în principal prin oxidare

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

monoterminală; la drojdii predomină de asemenea oxidarea monoterminală, dar la unele specii se întâlneşte şi oxidarea diterminală sau cea subterminală la C_2; mucegaiurile metabolizează alcanii în principal prin oxidare monoterminală, dar se poate întâlni destul de frecvent şi oxidarea subterminală la C_2, C_3, C_4, C_5 sau C_6. Rezultă deci, că pentru majoritatea microorganismelor oxidarea monoterminală la C_1 este calea majoră de metabolizare a alcanilor.

4. Metabolismul utilizării metanului şi metanolului

Metabolismul metanului şi metanolului la microorganismele metilotrofe presupune, pe de o parte, utilizarea lor ca sursă de energie, adică oxidarea în lanţul respirator, cu eliberarea de energie, stocată sub formă de ATP, iar pe de altă parte, utilizarea lor ca sursă de carbon, adică asimilarea pentru sinteza constituenţilor celulari.

4.1 Utilizarea metanului şi metanolului ca sursă de energie

Metanul este oxidat la metanol printr-o reacţie catalizată de o metan-monooxigenază. Oxigenul din metanol provine exclusiv din O_2, iar reacţia este similară cu cea a oxidării iniţiale a alcanilor:

$$CH_4 + NADH+H^+ + O_2 \longrightarrow CH_3OH + NAD^+ + H_2O$$

Oxidarea mai departe a metanolului, la majoritatea microorganismelor metilotrofe, constă dintr-o succesiune de trei reacţii:

$$CH_3\text{-}OH \xrightarrow{X \;\rightarrow\; XH_2} HCHO \xrightarrow{Y \;\rightarrow\; YH_2} HCOOH \xrightarrow{Z \;\rightarrow\; ZH_2} CO_2$$

în care X, Y, Z reprezintă diferiţi acceptori de electroni implicaţi in oxidarea metanolului, formaldehidei şi formiatului.

Oxidarea metanolului la formaldehidă este realizată la bacteriile metilotrofe de către o metanoldehidrogenază, pentru care, acceptorul primar de hidrogen este fenazinmetosulfatul (FMS):

$$CH_3\text{-}OH + FMS \longrightarrow HCHO + FMSH_2$$

Metanoldehidrogenaza este enzima cheie la toate bacteriile metilotrofe, deoarece iniţiază atât anabolismul, cât si catabolismul metanolului. Este o chinoproteină, având drept grupare prostetică o pteridină. Lanţul transportor de electroni al acestor bacterii conţine şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

citocromi şi anume, toate conţin cel puţin un citocrom c. Se pare că electronii acceptaţi de pteridină sunt cedaţi citocromului c. La levuri oxidarea metanolului la formaldehidă este catalizată de o metanol-oxidază, care utilizează oxigenul ca acceptor de electroni:

$$CH_3\text{-}OH + O_2 \rightarrow HCHO + H_2O_2$$

Enzima are mare afinitate pentru metanol, dar nu este specifică deoarece poate oxida şi alţi alcooli primari, dar nu şi alcooli secundari, terţiari sau aromatici. Metanol-oxidaza este o flavoproteină, la care, grupul prostetic este reprezentat de FAD (8 molecule de FAD/mol de enzimă). Faptul că la levurile metilotrofe, electronii rezultaţi din oxidarea metanolului sunt acceptaţi de oxigen, cu formare de peroxid de hidrogen, presupune intervenţia unei catalaze, care să descompună acest produs toxic. Într-adevăr, în extractele acelulare de *Candida boidinii* cultivată pe metanol, s-a evidenţiat o activitate catalazică de 20 – 70 de ori mai mare decât in cazul cultivării aceleiaşi specii pe glucoză sau etanol.

Deoarece catalaza prezintă şi o activitate peroxidazică, oxidând diferiţi metaboliţi cu ajutorul H_2O_2 generată de oxidaze, s-a sugerat posibilitatea catalazei de a oxida direct metanolul în timpul dezvoltarii levurilor pe acest substrat, presupunere care a fost verificată experimental.

Rezultă că levurile metilotrofe oxidează metanolul pe două căi:

- prin intermediul metanol-oxidazei;
- prin acţiunea peroxidazică a catalazei, care utilizează în acest caz peroxidul de hidrogen generat de prima enzimă (Fig 4).

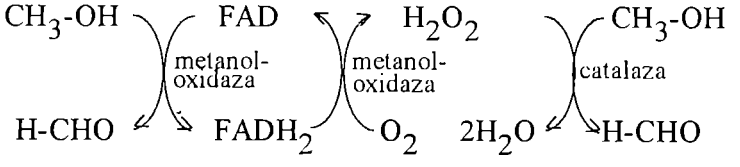
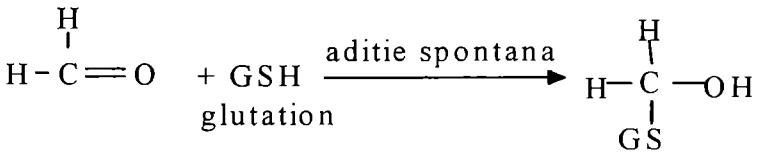
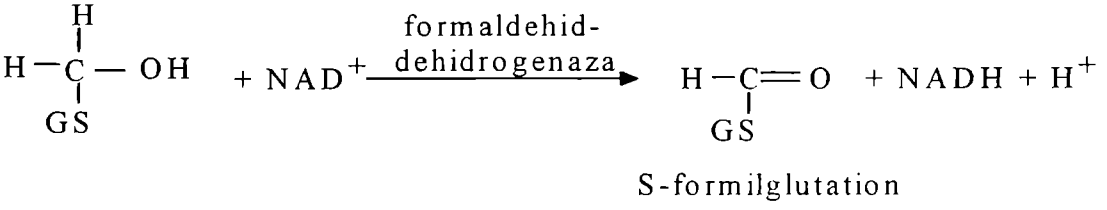


Fig.4. Oxidarea metanolului la drojdii

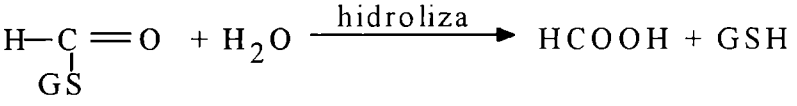
Etapa următoare este oxidarea formaldehidei la formiat. La levuri aceasta reacţie este catalizată de o formaldehid-dehidrogenază NAD şi glutation dependentă:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

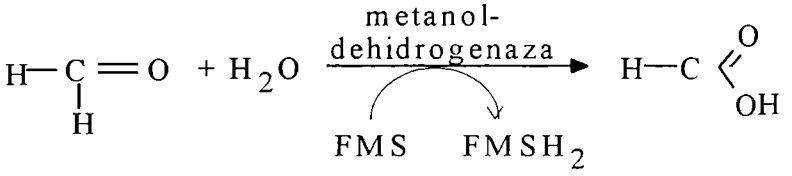




S-formilglutation



La bacterii, oxidarea formaldehidei la formiat nu e lămurită; după unii autori, reacţia decurge la fel ca la drojdii, după alţii, reacţia este catalizată tot de metanol-dehidrogenază, ca acceptor de hidrogen servind tot fenazinmetosulfatul (FMS). În această etapă de oxidare se formează atât la bacterii, cât şi la drojdii 2 – 3 molecule de ATP pe mol de substrat.



Ultima etapă este oxidarea formiatului la CO_2, reacţie catalizată de o formiat-dehidrogenază NAD-dependentă, reacţie similară atât la bacterii, cât şi la drojdii.

Se formează 3 molecule de ATP pe mol de substrat.

$$HCOOH + NAD^+ \longrightarrow CO_2 + NADH + H^+$$

Cu privire la localizarea enzimelor implicate în oxidarea metanului şi metanolului, la bacterii, metan-monooxigenaza este localizată numai în membrana plasmatică, în timp ce celelalte enzime sunt distribuite în spaţiul periplasmic, membrana plasmatică şi sistemul membranar intern derivat din membrana plasmatică. La drojdii, metanol-oxidaza, catalaza şi alte enzime sunt localizate în organite speciale numite peroxizomi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4.2 Utilizarea metanului şi metanolului ca sursă de carbon (pentru sinteza constituenţilor celulari)

Asimilarea metanului şi metanolului ca sursă de carbon, pune problema sintezei din compuşi cu C_1 de schelete carbonice cu C_3, de tip piruvat, fosfo-piruvat sau triozo-fosfat, precursori în sinteza materialului celular. Există trei căi prin care compuşii cu C_1 sunt utilizaţi în biosintezele celulare: a) încorporarea compusului C_1 sub formă oxidată, de CO_2, într-un glucid fosforilat (ciclul ribulozo-difosfat sau ciclul Calvin); b) incorporarea compusului C_1 sub formă mai redusă, de formaldehidă, într-un glucid fosforilat (ciclul ribulozo-monofosfat, sau ciclul alulozei sau ciclul Quayle); c) încorporarea compusului C_1 tot sub formă de formaldehidă, într-un aminoacid, glicina, formând serina (ciclul serinei). Asimilarea microbiană a metanolului prin utilizarea unor compuşi intermediari cu grade diferite de oxidare, necesită cantităţi diferite de ATP. Din punct de vedere bioenergetic asimilarea metanolului sub formă de CO_2 (ciclul Calvin) este puţin avantajoasă, deoarece presupune oxidarea formaldehidei la CO_2 şi apoi reducerea acestuia la un nivel de oxidare similar celui caracteristic constituenţilor celulari. În acest context, fixarea sub forma de formaldehidă, prin ciclul ribulozo-monofosfat (ciclul Quayle), reprezintă calea cea mai eficientă şi deci, calea cea mai frecvent întâlnită la bacteriile metilotrofe din genurile *Methylomonas, Methylococcus, Methylobacter, Methylophilus* şi la drojdiile metilotrofe (Fig 5).

După cum se observă, 3 molecule de formaldehidă sunt incorporate in 3 molecule de ribulozo-5-fosfat printr-o reacţie de condensare aldolică realizată de enzima hexulozo-fosfat sintaza. Rezultă 3 molecule de 3 ceto-hexulozo-6-fosfat (alulozo-6-fosfat), care se izomerizează in 3 molecule de fructozo-6-fosfat. Una dintre aceste molecule se transformă pe calea ciclului glicolizei în gliceraldehid-3-fosfat şi dihidroxiacetonfosfat, substanţe cu 3 atomi de carbon care intră în sinteza constituenţilor celulari. Celelalte două molecule de fructozo-6-fosfat împreună cu o parte din gliceraldehid-3-fosfat regenerază ribulozo-5-fosfatul. Hexulozo-6-fosfat sintaza este enzima cheie a acestui ciclu şi este parţial constitutivă, parţial indusă de metanol şi represată de formaldehidă (Fig. 5).

La unele bacterii metilotrofe din genurile *Methylosinus* şi *Methylocystis* asimilarea metanului şi metanolului se face pe calea ciclului serinei, deşi mai puţin economic din punct de vedere energetic, decât ciclul Quayle (Fig. 6).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

5. Obținerea unor tulpini microbiene cu proprietăți superioare, prin tehnici de inginerie genetică.

Un exemplu de realizare cu ajutorul ingineriei genetice a unei tulpini microbiene cu proprietăţi superioare este bacteria *Methylophilus methylotrophus* tulpina AS1, folosită pentru obţinerea de proteină în hrana animalelor. Tulpina AS1 foloseşte ca sursă de carbon metanolul şi ca sursă de azot amoniacul. Calea prin care azotul amoniacal este încorporat în compuşi organici, cu formare de acid glutamic, care intră în compoziţia proteinelor este calea GOGAT[1] (Fig. 7).

Sinteza acidului glutamic pe această cale se realizează prin succesiunea a două reacţii: sinteza unei molecule de glutamină din glutamat şi amoniac, cu participarea enzimei glutamin-sintetaza, reacţie care necesită ATP şi transferul unei grupări aminice la α–cetoglutarat (oxoglutarat) cu sinteza a doua molecule de glutamat, dintre care, una este molecula acceptor, reacţie catalizată de enzima glutamin-oxoglutarat-amino-transferază[2]. După cum se observă, această cale necesită consum de energie (ATP) în stadiul catalizat de glutamin-sintetaza.

[1] Denumirea actuală este calea glutamat sintazei.
[2] Denumirea actuală este: glutamat sintaza.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

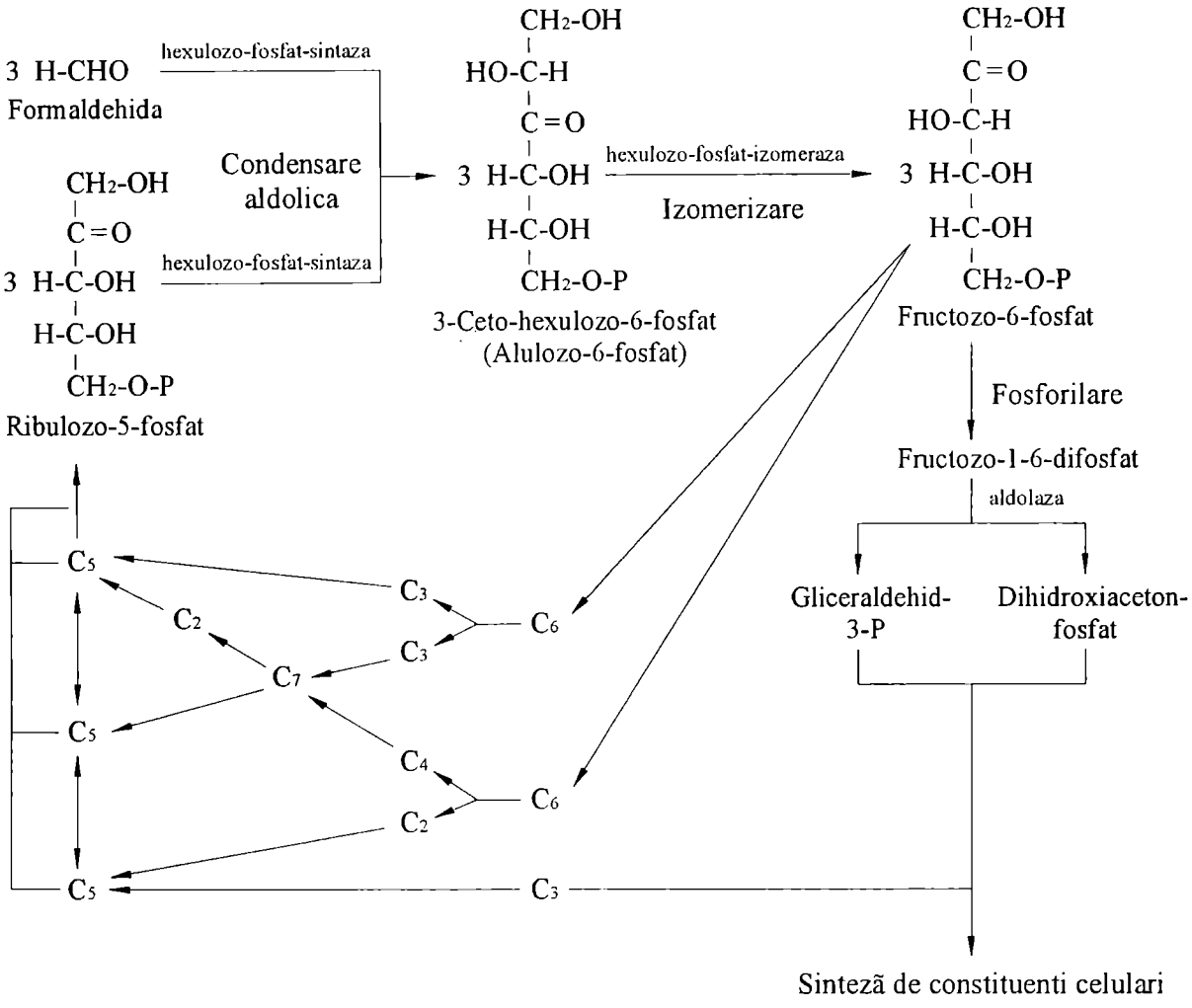


Fig. 5. Ciclul Quayle (ribulozo-monofosfat) pentru asimilarea metanolului de către bacteriile si drojdiile metilotrofe.

Legendã: C_2 = Glicolaldehidã activã

C_3 = Gliceraldehid-3-fosfat si Dihidroxiaceton-fosfat

C_4 = Eritrozo-4-fosfat

C_5 = Xilozo-5-fosfat si Ribozo-5-fosfat, care se izomerizeazã în Ribulozo-5-fosfat

C_6 = Fructozo-6-fosfat

C_7 = Sedoheptulozo-7-fosfat

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

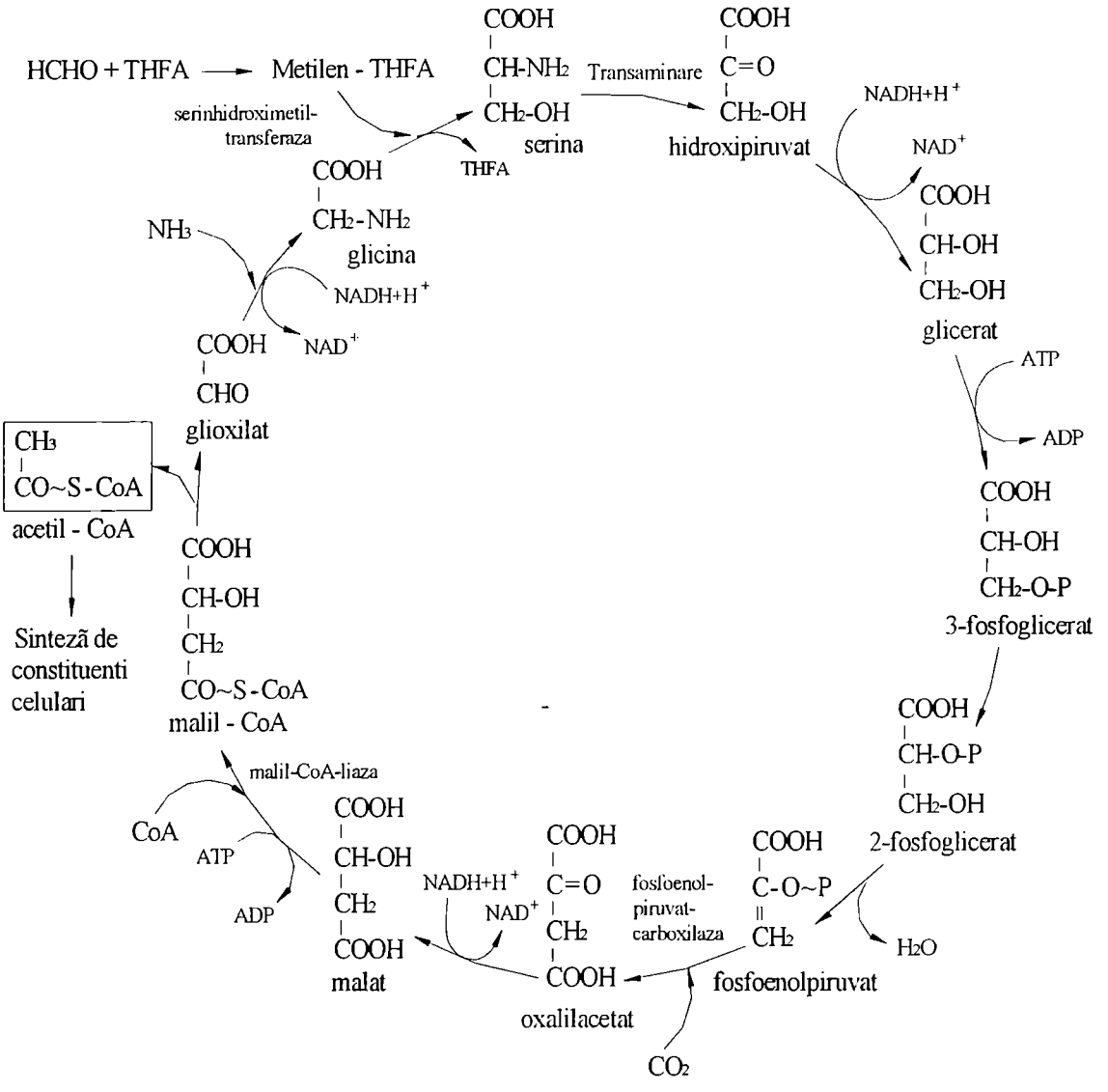


Fig. 6 Ciclul serinei pentru asimilarea metanolului la bacteriile metilotrofe din genul *Methylosinus* si *Methylocystis*

Legenda: THFA = acid tetrahidrofolic

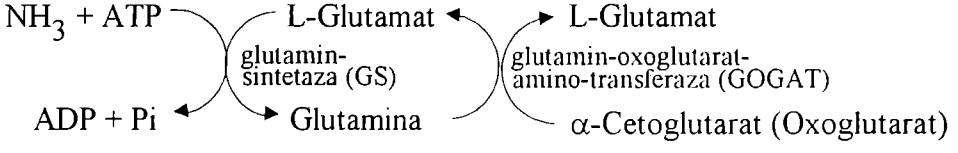
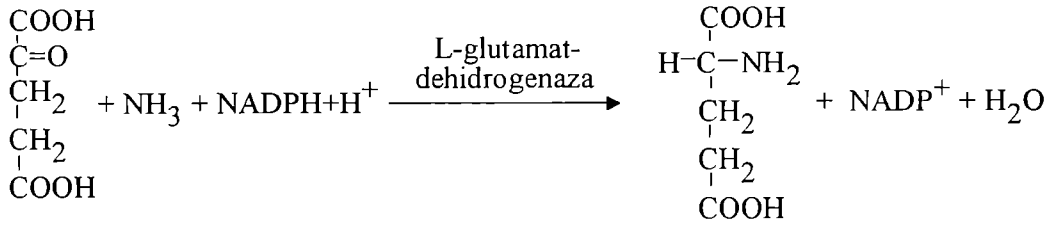


Fig. 7. Calea GOGAT de formare a acidului glutamic.

Legenda: Pi = fosfat

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

La alte bacterii, ca de exemplu, *Escherichia coli*, sinteza acidului glutamic se face prin aminare reductivă, cu participarea enzimei L-glutamat-dehidrogenaza, fără consum de energie.:



acid α-cetoglutaric acid L-glutamic

Problema care s-a pus a fost aceea de a obţine din bacteria *Methylophilus methylotrophus* AS1, mare consumatoare de energie în metabolismul azotului, o bacterie mai economică, folosind tehnicile ingineriei genetice.

În acest scop, de la *Methylophilus methylotrophus* AS1 s-a obţinut o mutantă auxotrofă GOGAT$^-$, incapabilă să folosească azotul amoniacal pentru sinteza acidului glutamic (Fig. 8-1). Prin tehnici de ADN recombinant, gena care codifică sinteza glutamat-dehidrogenazei (gdh) a fost izolată din cromozomul bacteriei *E. coli* şi introdusă intr-o plasmidă vector (Fig. 8-2). Plasmida recombinant obţinută a fost introdusă, prin conjugare sau transformare genetică într-o mutantă de *E. coli* gdh$^-$ (Fig 8-3). Celulele astfel transformate (gdh$^+$) se deosebesc prin capacitatea lor de a folosi azotul amoniacal, ceea ce mutanta gdh$^-$ nu putea face. Plasmida recombinant obţinută este din nou izolată din celulele de *E. coli* gdh$^+$ (Fig 8-4) şi introdusă în celulele mutante AS1 gogat$^-$ (fig. 8-5). Celulele transformate obţinute sunt celule gdh$^+$, deci capabile să asimileze amoniacul pe calea glutamat-dehidrogenazei care necesită consum mai mic de energie, deci este mai economică. Deşi economia de energie este aparent neînsemnată, atunci când în producţie se pune problema obţinerii de mii de tone de produs, această economie devine esenţială.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

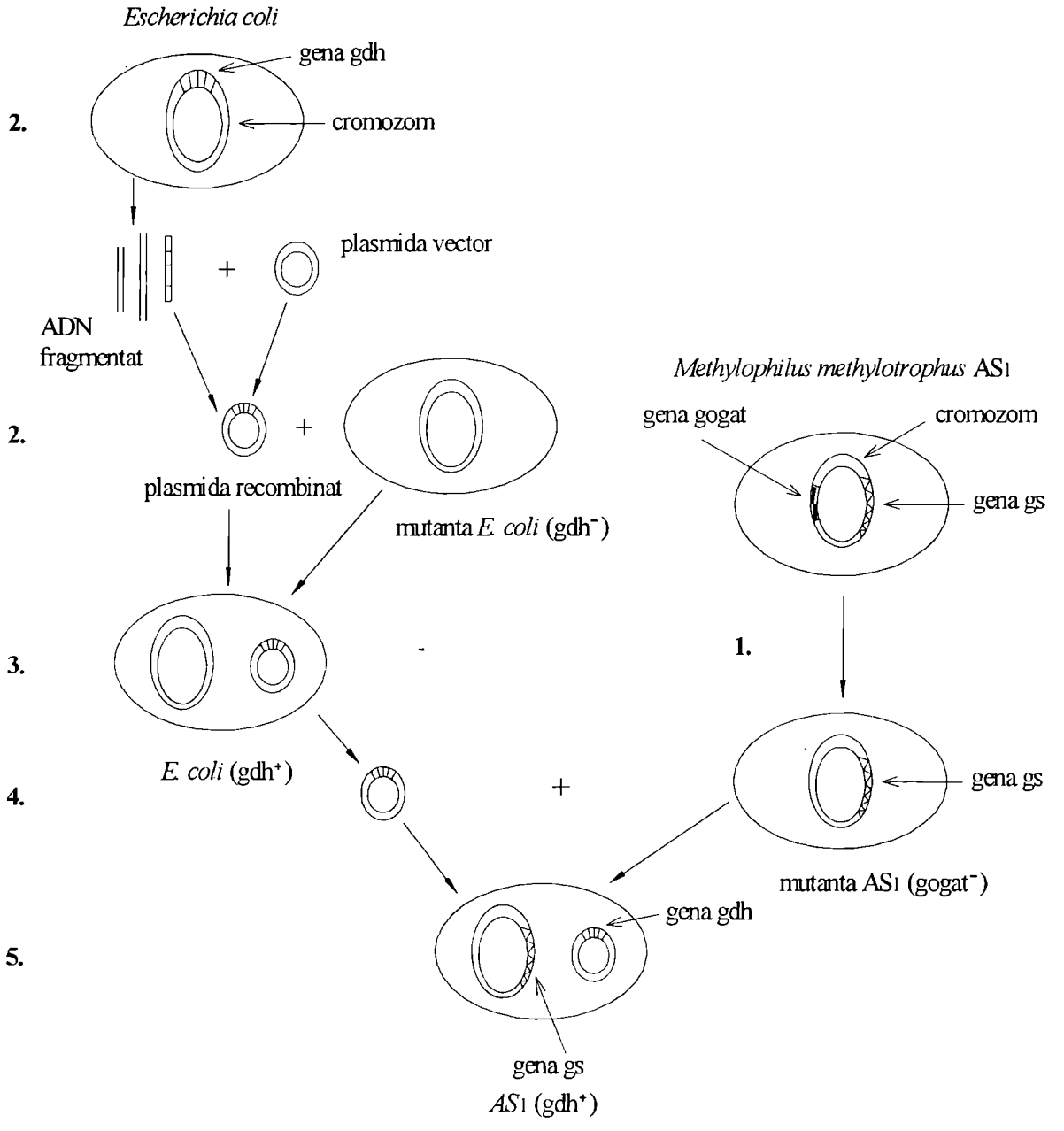


Fig. 8. Obtinerea prin tehnici de inginerie geneticã a unei tulpini de *Methylophilus methylotrophus* AS1 cu proprietãti superioare.

Legenda: gdh = glutamat dehidrogenaza;

gs = glutamin - sintetaza;

gogat = glutamin-oxoglutarat-amino-transferaza (glutamat sintaza);

gene gdh, gs, gogat = gene responsabile de sinteza enzimelor respective.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

6. Tehnologia obținerii de biomasă microbiană

6.1 Factorii care condiţionează producerea de biomasă microbiană

1. **Sursa de carbon şi energie**

În cazul substratelor zaharate, ele necesită adesea un tratament preliminar, care variază după natura substratului folosit.

Astfel, **melasele** sunt diluate, acidificate, îmbogăţite în fosfat de calciu şi factori de creştere şi după fierbere şi neutralizare sunt decantate şi filtrate.

Substratele amidonoase necesită o fierbere prealabilă pentru gelificarea amidonului, urmată de zaharificare cu malţ sau un preparat amilolitic microbian.

Alcanii trebuie aduşi sub formă de emulsie cât mai fină, pentru a fi accesibili microorganismelor, în vederea oxidării. Indiferent însă de substratul utilizat, adaptarea microorganismului la acesta este de mare importanţă, lucru care se realizează prin pasaje succesive pe substratul respectiv.

2. **Sursa de azot**

De obicei se foloseşte amoniacul, sărurile de amoniu sau ureea. Cercetările au demonstrat influenţa sursei de azot, în special a ureei, asupra vitezei de creştere şi a conţinutului de proteine al microorganismului respectiv. Astfel, în cazul drojdiilor cultivate pe n-parafine, s-a obţinut un conţinut proteic de 48,5%, când sursa de azot a fost sulfatul de amoniu în concentraţie de 0,5 – 1,0 g% şi de 56,9% când sursa de azot a fost ureea, în concentraţie de 0,5g%. Nu există o explicaţie foarte clară asupra acestei constatări. Glutamin sintetaza este prezentă în două forme: o formă activă şi una inactivă, care se formează atunci când reziduurile de adenil din ATP se ataşează la enzimă, proces numit adenilare. Adenilarea este stimulată de concentraţiile mari de NH_4^+, care duc, de obicei, la inactivarea enzimei.

În situaţiile în care concentraţia de amoniu în mediu este mare, are loc asimilarea lui pe calea GOGAT. Când scade concentraţia NH_4^+ are loc deadenilarea GS şi din nou NH_4^+ este asimilat pe calea GS.

Acest control implică o modificare covalentă a enzimei (nu o schimbare a conformaţiei enzimei). Se presupune că rolul adenilării este de a preveni consumarea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

exagerată a ATP pe calea GS în cazurile în care nivelul NH_4^+ este suficient de mare pentru activitatea aminoacid dehidrogenazelor (care nu necesită ATP pentru funcționare).

O cauză ar putea fi stabilitatea mai mare a indicelui pH în cazul mediului conţinând uree, deoarece descompunerea sulfatului de amoniu eliberează acid sulfuric, a cărui neutralizare continuă este necesară şi sărurile care rezultă măresc presiunea osmotică în condiţii mai puţin favorabile.

O altă cauză ar putea fi faptul că procesele metabolice se efectuează în alt mod pornind de la sulfat de amoniu şi în altul de la uree.

3. **Aerarea şi agitarea**

Cantitatea de aer şi modul distribuirii sale constituie factori critici în eficienţa producerii de masă celulară.

În cazul în care sursa de carbon e reprezentată de hidrocarburi, consumul de oxigen este de 3 ori mai mare decât în cazul glucidelor, care conțin ele înşile oxigen (jumătate din greutatea lor). În cazul metanolului consumul de oxigen este intermediar între glucide şi hidrocarburi.

Modul de distribuire a aerului este de asemenea un factor important, dat fiind solubilitatea mică a oxigenului, care în mediul de cultură nu depăşeşte 5-6 mg/l. În scopul unei cât mai bune aerări, s-au construit diferite tipuri de bioreactoare, dintre care, cele mai folosite sunt bioreactoarele tip Vogelbusch, în care dispersia aerului se realizează cu diferite tipuri de agitatoare, sau bioreactoarele tip Lefrançois, care realizează o amestecare intimă a mediului cu aerul, prin crearea unor curenţi în interiorul bioreactorului, care determină o urcare a lichidului în partea centrală şi o coborâre în zonele periferice.

Deoarece, după cum se observă, aerarea este însoţită de agitare, care antrenează formarea de spumă, folosirea substanţelor antispumante este obligatorie. Se folosesc în acest scop: dodecanol, hexadecanol, ulei de ricin sulfonat.

6.2 Producerea de biomasă microbiană în funcție de tipul de microorganism utilizat

1. Drojdiile

Dintre toate microorganismele, drojdiile au fost cele mai studiate în vederea obţinerii de biomasă, respectiv de proteină, deoarece lipsa lor de toxicitate pentru organismul uman şi animal a fost deja verificată şi confirmată în timp. Folosirea drojdiilor ca sursă de proteine presupune două aspecte:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- obţinerea de drojdie furajeră pentru nutriţia animalelor;
- obţinerea de drojdie alimentară pentru nutriţia omului.

Condiţiile tehnologice de fabricare sunt similare; diferă materia primă utilizată şi tratamentul final al produsului, drojdia alimentară fiind un produs mai rafinat decât drojdia furajeră. În ceea ce priveşte materia primă, drojdia alimentară se obţine pe melasă sau pe zer.

La baza procedeului de producere de biomasă de către drojdii stă fenomenul cunoscut sub numele de efect Pasteur, adică inhibarea fermentaţiei prin respiraţie. Pentru aceasta, drojdia se cultivă în condiţii de aerare intensă, concentraţia de zahăr din mediu fiind menţinută la un nivel scăzut, pentru evitarea formării de alcool, în favoarea producerii de biomasă. Prima dată s-a aplicat acest principiu la producerea drojdiei comprimate cu *Saccharomyces cerevisiae*, folosită în panificaţie, şi acelaşi principiu stă şi în prezent la baza procedeelor folosite în fabricile de drojdie furajeră şi alimentară, care folosesc glucidele ca sursă de carbon.

Drojdia folosită în panificaţie este comercializată în două forme: drojdie comprimata şi drojdie uscată. Drojdia comprimată se prepară prin amestecarea drojdiei centrifugate cu emulgatori, amidon şi alţi aditivi, până se asigură consistenţa adecvată pentru comprimarea în blocuri sau cubuleţe, care sunt apoi ambalate. Cuburile de drojdie comprimată au o umiditate de ~ 70% şi o densitate celulară de $2x10^{10}$ celule/g. Ea trebuie păstrată la 4°C pentru a-şi menţine activitatea.

Drojdia uscată activă se obţine din drojdia spălată şi centrifugată, care este apoi amestecată cu aditivi şi uscată sub vid la 25-45°C timp de 6 ore, până când umiditatea este redusă la 8%. Apoi pudra este împachetată în recipiente în care nu pătrunde aerul (din carton, pliculeţe de hârtie pluristratificată), uneori chiar sub atmosferă de N_2 pentru a asigura o mai mare durată de viabilitate. aceasta formă de drojdie are o putere de dospire mai mică decât cea in formă comprimată, dar, în schimb, are o viabilitate mai mare.

Tehnologia obţinerii drojdiei pe produse petroliere s-a dezvoltat în două direcţii: cultivarea drojdiilor pe petrolul brut, conform procedeului de la Lavéra, care realizează în acelaşi timp deparafinarea petrolului şi dezvoltarea drojdiilor pe n-parafine purificate, după procedeul laboratorului Grangemouth (Scoţia).

Primul procedeu prezintă avantajul eliminării operaţiilor de separare a n-parafinelor care implică o instalaţie complexă şi costisitoare, realizând concomitent o purificare a petrolului. Dezavantajul metodei constă în faptul că în produsul finit pot trece cantităţi însemnate de hidrocarburi aromatice care sunt toxice pentru animale. Ca urmare, se impune

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

un procedeu complex de purificare a drojdiei prin extracţie cu diferiţi solvenţi, fapt care reduce din avantajele menţionate. Procedeul de cultivare pe n-parafine permite în condiţiile actuale de dezvoltare tehnică, reducerea conţinutului de substanţe aromatice, la 0,05% ceea ce nu prezintă nici un pericol pentru organism. Ca urmare, această metodă este preferată prima, datorită eviării riscurilor de toxicitate, majoritatea instalaţiilor industriale având la bază acest procedeu. Industrial se folosesc n-parafinele cu C_{14} – C_{22}, dar se pot utiliza şi parafinele solide, după dizolvarea lor într-un solvent adecvat.

Principalele **etape** de obţinere a concentratului de proteine – vitamine, reprezentat de drojdia furajeră şi alimentară sunt următoarele:

- Pregătirea inoculului: se pleacă de la o cultură pură de drojdie (*C. utilis* sau altă specie adecvată de *Candida*) obţinută pe malţ-agar sau pe geloză glucozată cu adaos de extract de drojdie.
- Producerea biomasei de drojdie cuprinde trei faze: faza iniţială, în care drojdia trece din starea latentă în starea de înmugurire; faza acumulării biomasei de drojdie, în care, creşterea biomasei se realizează prin apariţia continuă de generaţii noi de celule, care se înmulţesc prin înmugurire; faza finală în care are loc maturarea celulelor de drojdie.
- Separarea biomasei de mediul de cultură se face prin centrifugări şi spălări repetate.
- Purificarea este absolut obligatorie, în cazul obţinerii concentratului proteic de levuri pe n-parafine din petrol, în scopul eliminării hidrocarburilor reziduale care dau un gust neplăcut şi sunt toxice, precum şi al degresării, tot în vederea ameliorării gustului. Lipidele şi hidrocarburile reziduale se elimină prin spălare cu solvenţi ca: etanol, eter, izopropanol, butanol, hexan sau amestecuri ale acestora.
- Prelucrarea biomasei presupune două operaţii: plasmoliza şi uscarea. Plasmoliza este necesară pentru ruperea pereţilor celulari, care opun rezistenţă la acţiunea acidului clorhidric din sucul gastric şi a enzimelor digestive. În mod obişnuit se face plasmoliză la 64°C, urmată de uscare prin pulverizare.

Drojdia furajeră şi alimentară se prezintă ca un praf uscat, gălbui-brun, cu gust şi miros caracteristic, cu umiditatea de 7-8%. Conţine în general, 50% proteine, 25-35% glucide, 6% acizi nucleici, 6-8% substanţe minerale, 2-3% lipide, precum şi vitamine din grupul B. Conţinutul de acizi nucleici este destul de ridicat totuşi, şi de aceea, pentru reducerea lui, după ruperea pereţilor celulari se aplică diferite procedee ca: tratare cu amestec de NaCl şi acetat

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de Na, sau cu amestec de metanol sau etanol şi HCl; tratare cu amoniac apos tratament termic combinat cu RNA-ază pancreatică.

2. Bacteriile

Datorită vitezei mari de multiplicare, bacteriile se pretează foarte bine pentru obţinerea, cu randament ridicat, a proteinelor prin biosinteză. Cele mai folosite materii prime sunt: deşeurile celulozice (pentru *Cellulomonas sp.*), n-parafinele din petrol, metanul şi metanolul, ultimul fiind din ce în ce mai mult utilizat. Într-o serie de ţări ca Japonia, Germania, Anglia se produce deja proteină comercială din metanol cu ajutorul bacteriilor. De exemplu, proteina comercială *PRUTEEN*, produsă de Imperial Chemical Industries (Anglia) este obţinută din metanol cu bacteria obligat metilotrofă *Methylophilus methylotrophus*. Ca şi la drojdii şi la bacterii se pune problema reducerii conţinutului de acizi nucleici celulari.

O importanţă practică deosebită o prezintă şi cianobacteriile din genurile: *Nostoc, Oscillatoria, Spirulina*. În special speciile de *Spirulina*, ca de exemplu *Spirulina platensis*, prezintă nişte avantaje certe pentru obţinerea de proteină şi anume:

- fiind de dimensiuni mari, separarea de mediul de cultură se poate face prin simplă filtrare, operaţie mai puţin costisitoare decât centrifugarea;
- se dezvoltă în mediu alcalin la pH = 8,0 – 11,0 , pH la care CO_2 este fixat sub forma ionilor carbonat şi bicarbonat. Este deci suficient să se asigure iniţial o rezervă convenabilă de ioni bicarbonat şi să se menţină constantă această rezervă , ceea ce face ca producţia de *Spirulina* să fie foarte rentabilă din punct de vedere economic.

3. Algele

Cele mai multe cercetări s-au făcut pe algele verzi din genul *Chlorella* (*Chlorella vulgaris, Chlorella pyrenoidosa*) şi *Scenedesmus* (*Scenedesmus obliquus*). Condiţiile de cultivare trebuie să asigure următorii parametri principali:

- substanţe nutritive în concentraţii adecvate;
- o cantitate maximă de CO_2 solubilizat;
- o iluminare optimă în ceea ce priveşte lungimea de undă şi intensitatea;
- asigurarea unui pH şi a unei temperaturi optime;
- agitarea mediului in vederea evitării depunerii algelor şi asigurării unei distribuţii uniforme a CO_2, sărurilor minerale şi luminii;
- prevenirea fenomenelor de infecţie.

Cultivarea algelor se poate realiza în sisteme deschise (bazine, jgheaburi) sau închise, complet automatizate şi în flux continuu. Cu toate rezultatele obţinute, cultivarea algelor nu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

s-a extins prea mult, datrorită pretului de cost ridicat, determinat în primul rând de cantitatea mare de CO_2 necesară, pentru menţinerea în mediul uşor acid (pH = 6,0 – 6,8) în care se dezvoltă algele, a unei cantităţi suficiente de CO_2. Prevenirea infecţiilor, în special în bazinele deschise, este de asemenea o problemă. Din acest punct de vedere, utilizarea sistemelor închise de cultivare este mai avantajoasă, dar în acelaşi timp , mai costisitoare.

7. Probleme privind utilizarea actuală şi de perspectivă a microorganismelor ca sursă de proteine.

Utilizarea actuală şi în perspectivă a proteinelor microbiene pune mai multe probleme, dintre care, cele mai importante sunt: valoarea nutritivă, toxicitatea, digestibilitatea şi acceptabilitatea.

7.1 Valoarea nutritivă se referă la conţinutul în proteină al celulei microbiene şi la conţinutul de aminoacizi esenţiali ai acestei proteine, aspect pe care l-am discutat la începutul acestui capitol. După cum se observă din tabelul 2, proteina microbiană este bogată în lizină dar mai săracă în aminoacizi cu sulf, comparativ cu proteina din alte surse (făină de soia, făină de peşte) sau cu proteina de referinţă F.A.O.. Valoarea nutritivă a proteinei microbiene se poate mări prin adaus de D-L-metionină sintetică, care este foarte ieftină. S-a constatat că în cazul suplimentării proteinei microbiene cu 0,3% metionină, valoarea biologică creşte de la 61 la 91. Evaluarea valorii nutritive a proteinei microbiene s-a făcut prin testare pe diferite specii de animale sălbatice şi domestice. În cazul drojdiei furajere, norma medie este de 1g drojdie uscată pentru 1 kg greutate a animalului viu, în 24 de ore. În toate cazurile, s-a obţinut creşterea în greutate a animalelor şi în plus, la animalele cu blană, o mărire a rezistenţei la îmbolnăviri şi o îmbunătăţire a calităţii blănii, iar la păsări, o creştere a producţiei de ouă.

7.2 Toxicitatea se referă nu numai la proteina microbiană obţinută pe n-alcani, ci la orice proteină microbiană. Uniunea Internaţională de Chimie pură şi aplicată (IUPAC) a stabilit că nici o sursă nouă de proteine nu poate fi admisă în hrana animalelor decât dacă se constată absenţa oricărei toxicităţi.

Testele toxicologice includ toxicitatea acută (se urmăreşte timp de 6 săptămâni pe şobolani), toxicitatea subcronică (3 luni) şi toxicitatea cronică (2 ani). Deoarece unii compuşi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

aromatici policiclici prezenţi în petrol sunt cunoscuţi ca substanţe cancerigene, conţinutul în aceşti compuşi în biomasa microbiană obţinută pe produse petroliere este de mare interes. Totuşi, s-a constatat că drojdiile cultivate pe n-alcani puri, conţin cantităţi minime de compuşi aromatici policiclici, mai puţin de 5ppb (părţi per bilion), aşa cum recomandă standardele IUPAC (Tabelul 3).

Aceleaşi recomandări privind toxicitatea se aplică şi proteinei obţinută pe metan şi metanol, deşi metanolul este mai pur din punct de vedere chimic. Este adevărat că mici cantităţi de produşi secundari sunt totdeauna prezente în concentraţii variate, dar microorganismele nu
utilizează aceste impurităţi şi în timpul uscării, ele sunt complet îndepărtate. Pe de altă parte,

Tabel 3. Standardele recomandate de IUPAC, privind toxicitatea biomasei microbiene

Benzopiren (ca indicator al prezenţei hidrocarburilor aromatice policiclice)	5 ppb
Substanţă pozitivă la reactivul acetil-acetonă (ca formaldehidă)	20 ppm
Pentru biomasa derivată din alcani: hidrocarburi totale	0,5%
hidrocarburi aromatice totale	0,05%

substratul însuşi este controlat de aşa manieră, încât să asigure completa lui consumare de către micoorganism şi conversia în proteină, fără formarea de metaboliţi secundari. Conform recomandărilor IUPAC, concentraţia de metanol rezidual şi de formaldehidă în biomasă nu trebuie să fie mai mare de 20 ppm.

În afara toxicităţii, din punct de vedere sanitar, interesează şi aspectul microbiologic, adică respectarea condiţiilor de sterilitate pe parcursul procesului de biosinteză, care se reflectă în absenţa unor microorganisme dăunătoare în produsul finit. Din acest punct de vedere, IUPAC a stabilit şi standarde microbiologice pentru proteina microbiană folosită în nutriţia animalelor (Tabelul 4).

7.3 Digestibilitatea se referă la faptul că peretele celular microbian este nedigerabil şi de aceea trebuie degradat pentru a favoriza accesul enzimelor digestive. În plus, pereţii celulari microbieni nedegradaţi pot provoca unele deranjamente gastro-intestinale. În cazul drojdiilor, degradarea peretelui celular se face de obicei prin plasmoliză la 64°C.

7.4 Acceptabilitatea este o problemă majoră în utilizarea practică a proteinei microbiene. Pentru animale numai gustul contează. Din acest punct de vedere, drojdia furajeră este la ora actuală de mare importanţă în nutriţia animalelor, tinzând să rezolve problema furajelor, independent de producţia agicolă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel 4. Standarde microbiologice recomandate de IUPAC pentru proteina microbiană folosită în nutriția animalelor.

Microorganism	per gram
Număr bacterii viabile (total bacterii aerobe)	100.000
Mucegaiuri viabile	100
Enterobacteriaceae	10
Salmonella	1*
Staphylococcus aureus	1
Total clostridii	1000
Clostridium perfringens	100
Streptococi grup D	10.000

* per 50 g.

În ceea ce priveşte nutriţia oamenilor, problema este mai complicată, deoarece pentru om, pe lânga gust, un rol deosebit îl joacă mirosul, culoarea, aroma şi consistenţa. Din punct de vedere al gustului, *Candida arborea* are gustul cel mai plăcut, urmată de *Candida utilis*. Experienţele de distribuire a drojdiei la diferite categorii de oameni, în special copii şi bolnavi, au dus în toate cazurile la rezultate pozitive: creşteri în greutate, îmbunătăţirea stării de sănătate. Un aport zilnic de 15 g drojdie corespunde unui echivalent proteic de 40 g carne. Levurile comercializate pentru nutriţia omului se prezintă sub formă de praf, incorporabil în lapte, apă, mâncăruri; drajeuri; biscuiţi levuraţi; grisine levurate; preparate levurate pentru micul dejun ca: amestec de parmezan uscat şi 10% drojdie, pastă pentru sandviciuri din 2 părţi unt şi 1 parte drojdie; supe pudră, conţinând 40 – 45% drojdie.

Cât priveşte algele, culoarea lor verde şi gustul de spanac sunt principalele obstacole în calea acceptării ca atare a prafului de *Chlorella* în alimentaţia omului. Proteina algelor este acceptată totuşi, dacă se adaugă la alte alimente ca: prăjituri, pişcoturi, îngheţată.

Posibilităţile de combinare şi ajustare a hranei tradiţionale cu proteinele microbiene sunt nelimitate şi se speră obţinerea în viitor a unor rezultate care să mărească sfera de acceptabilitate a proteinelor microbiene.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL III

PRODUŞI FINALI AI METABOLISMULUI ENERGETIC: PRODUŞI DE FERMENTAŢIE

Fermentaţiile sunt procese anaerobe, producătoare de energie, în care, substanţele organice acţionează atât ca donori, cât şi ca acceptori de electroni. Diferitele tipuri de fermentaţii se deosebesc între ele prin produşii finali, care reflectă diferite căi de metabolizare mai departe a acidului piruvic, rezultat din degradarea glucidelor pe calea Embden-Meyerhof-Parnas, sau ciclul glicolizei. Formarea diferiţilor produşi finali de fermentaţie are loc ca urmare a regenerării NAD din $NADH_2$. O schemă a metabolismului piruvatului, ducând la cele mai importante fermentaţii este dată în Figura 9.

1. Fermentaţia alcoolică

Fermentaţia alcoolică este procesul biologic prin care, glucidele din mediu sunt transformate în alcool etilic şi dioxid de carbon de către drojdii.

1.1. Drojdii

Drojdiile care produc fermentaţia alcoolică aparţin în general genului *Saccharomyces*. După comportarea la fermentaţie se împart în două categorii:

1. **Drojdii de fermentaţie superioară (de suprafaţă),** care prezintă următoarele caracteristici:

- Se ridică în timpul fermentaţiei la suprafaţa mediului rămânând în spuma ce se formează, dându-i un aspect mat, lăptos;
- Depozitul format după liniştirea fermentaţiei este puţin aderent, astfel încât, la o uşoară agitare se ridică în mediu;
- Ansamblul format prin multiplicare este arborescent;
- Prezintă şi metabolism aerob, în afara celui anaerob;
- Spectrul citocromic cuprinde 4 benzi;
- Temperatura optimă de fermentaţie: 25°-30°C;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

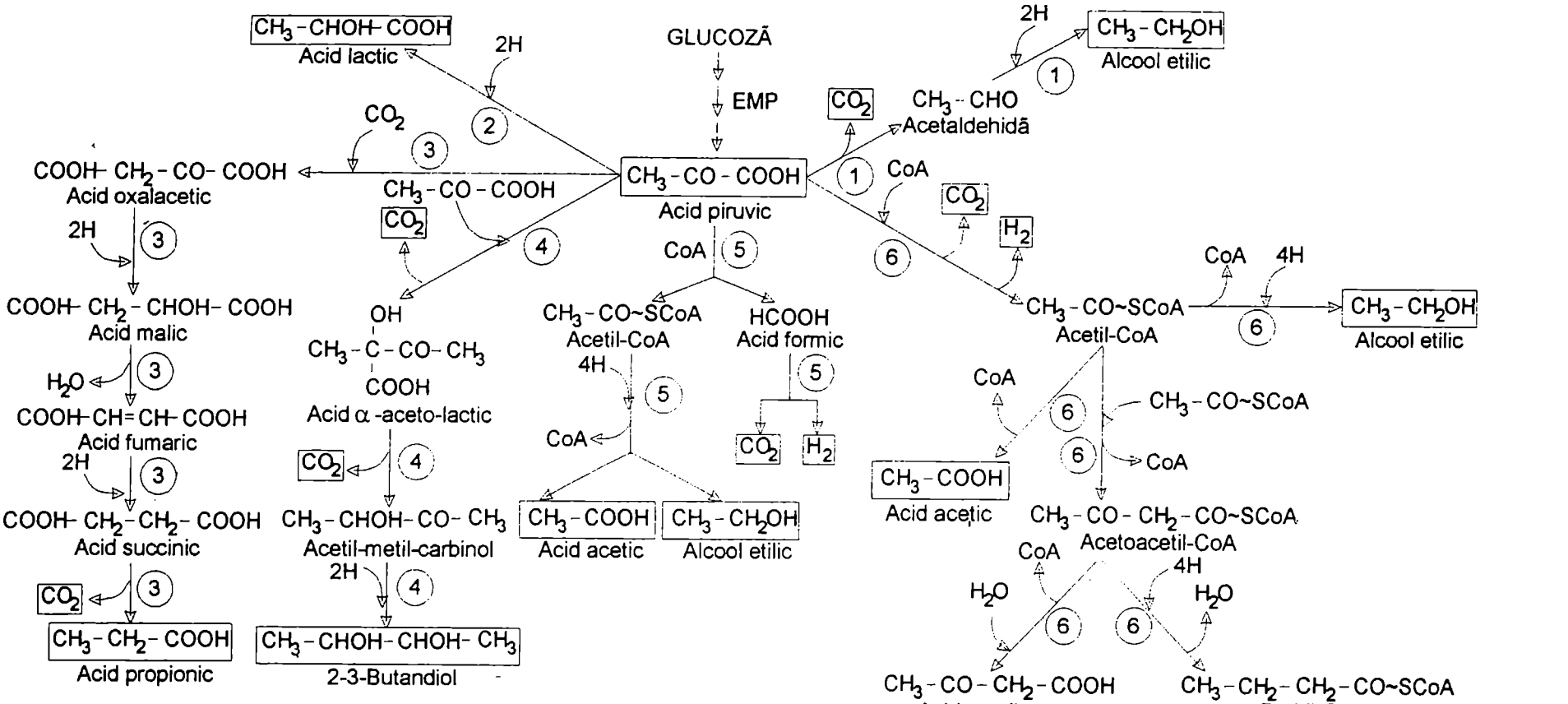


Fig. 9. Schema metabolizării piruvatului cu formarea diferiților produși de fermentație

Legenda:
① = fermentația alcoolică (g. *Saccharomyces*) cu produși principali: alcool etilic și dioxid de carbon;
② = fermentația lactică (g. *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus*) cu produs principal: acid lactic;
③ = fermentația propionică (g. *Propionibacterium*) cu produși principali: acid propionic și dioxid de carbon;
④ = fermentația butandiolică (*Enterobacter aerogenes*) cu produși principali: 2-3 butandiol și dioxid de carbon;
⑤ = fermentația formică (g. *Enterobacter, Escherichia coli*) cu produși principali: acid acetic, alcool etilic, dioxid de carbon și hidrogen;
⑥ = fermentațiile butirică (*Clostridium butyricum*) cu produși principali: acid butiric, acid acetic, dioxid de carbon și hidrogen; acetono-butilică (*C. acetobutylicum*) cu produși principali: alcool butilic, alcool etilic, acetona, dioxid de carbon si hidrogen; izopropilică (*Clostridium butylicum*) cu produși principali: alcoolul izopropilic, alcoolul butilic, alcoolul etilic, dioxidul de carbon și hidrogenul.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- Fermentează numai 1/3 din molecula rafinozei, din lipsa enzimei melibiaza, care desface melibioza în glucoză şi galactoză; drojdiile de fermentaţie superioară posedă numai invertază, nu şi melibiază (Fig. 10);
- Sporulează uşor;
- Sunt comune în natură. Specii tipice: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, utilizate la fabricarea spirtului, în vinificaţie şi în panificaţie.

2. **Drojdii de fermentatie inferioară (de fund),** care prezintă următoarele caracteristici:

- În timpul fermentaţiei celulele nu ajung la suprafaţa mediului, spuma având de aceea un aspect sticlos;
- Depozitul format după liniştirea fermentaţiei este foarte aderent şi foarte greu de răscolit;
- Ansamblul format prin multiplicare este aglomerat;
- Prezintă în principal metabolism de tip anaerob;
- Spectrul citocromic cuprinde 2 benzi;
- Temperatura optimă de fermentaţie: 5°-10°C;
- Fermentează total rafinoza, având echipamentul enzimatic complet;
- Sporulează greu sau deloc;
- Sunt rare în natură. Specii tipice: *Saccharomyces carlsbergensis* (*S. uvarum*), *S. validus*, utilizate la fabricarea berii.

Pentru un proces industrial de fermentaţie alcoolică, drojdiile alese trebuie să aibă un randament mare de produs final pe unitatea de substrat asimilată, o rată ridicată de fermentaţie, o toleranţă ridicată la etanol, capacitatea de a rămâne viabile la temperaturi ridicate, stabilitate în condiţii adecvate de fermentaţie şi o toleranţă la valori de pH scăzute. În general, drojdiile sunt capabile să utilizeze o varietate de substrate, producând etanol la valori de pH între 3,5-6,0 şi temperaturi de la 28° C la 35 °C. De interes în producerea unor randamente mari de etanol este şi inducerea de mutante de drojdie cu deficienţe respiratorii, obţinute prin folosirea unor agenţi chimici cum sunt coloranţii de intercalare, sau compuşii de denaturare ai proteinelor. Aceste mutante, numite "petite", sau "Q" conţin un ADN mitocondrial alterat, ceea ce suprimă producerea enzimelor necesare metabolismului aerob. Astfel, acest tip de mutante reprezintă un tip de celulă total angajată în sinteza alcoolului etilic.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

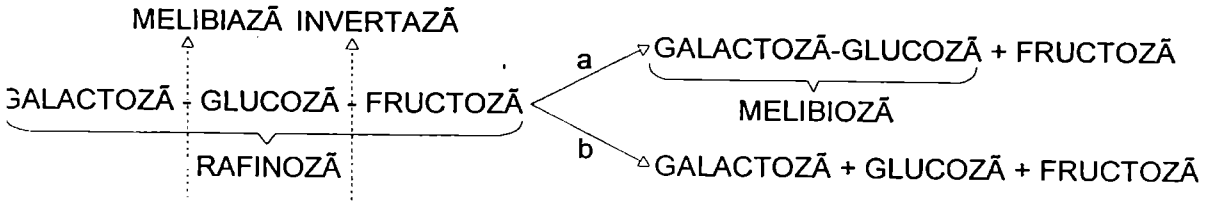


Fig. 10. Fermentarea rafinozei de către drojdiile de suprafață (a) şi de fund (b)

1.2. Alte microorganisme producătoare ale fermentaţiei alcoolice

Din 1981 au fost studiate mai atent bacteriile, pentru producerea de etanol. S-a arătat că *Zymomonas mobilis* poate converti glucoza la etanol, rapid, cu o rată specifică a consumului glucozei, mai mare decât *S. cerevisiae*. Totuşi, bacteriile par să fie mai puţin tolerante la concentraţiile mari de etanol decât drojdiile, ceea ce face nesigură utilizarea lor într-o serie de fermentaţii.

1.3. Substratul de fermentaţie este reprezentat de glucide, deşi nu toate glucidele sunt fermentescibile. Astfel, dintre hexoze sunt uşor fermentate: glucoza, fructoza şi manoza. Galactoza este fermentată numai de drojdiile adaptate în acest scop. Dintre pentoze, arabinoza şi xiloza sunt fermentate de unele specii de drojdii. Dizaharidele sunt fermentate numai dacă drojdiile posedă enzimele necesare hidrolizei acestora în glucide simple. Sunt hidrolizate în special maltoza şi zaharoza, deoarece, majoritatea drojdiilor conţin maltază şi invertază. Lactoza este mai greu fermentată, deoarece puţine drojdii conţin lactaza necesară. Dintre trizaharide, rafinoza este fermentată complet numai de drojdiile de fermentaţie inferioară, care conţin atât invertază, cât şi melibiază. Dintre polizaharide, amidonul şi glicogenul nu sunt fermentate de drojdii, deoarece acestea nu conţin amilază. Dextrinele şi maltotetroza sunt fermentate numai de drojdiile aparţinând speciei *Saccharomyces diastaticus*, care conţine o glucamilază extracelulară ce poate hidroliza aceste macromolecule în glucoză.

În procesele industriale de fermentaţie alcoolică nu se folosesc însă glucide pure, ci **deşeuri** ale diferitelor industrii, care conţin aceste glucide. Printre acestea amintim: **melasa** de trestie şi de sfeclă, deşeu al fabricilor de zahăr, conţinând zaharoză şi zahăr invertit cu o concentraţie totală de glucide de 50-60 %; **leşiile sulfitice**, deşeu obţinut în combinatele de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

celuloză şi hârtie, conţinând în special pentoze şi hexoze; **zerul**, deşeu al fabricilor de brânzeturi, conţinând lactoză; **substrate amidonoase**, reprezentate de cereale (porumb în special) si cartofi, acestea necesitând în prealabil hidroliza lor acidă, sau enzimatică în glucide simple.

1.4 Biochimia fermentaţiei alcoolice

1. Produşii principali ai fermentaţiei alcoolice

Gay-Lussac a făcut un studiu cantitativ al produşilor fermentaţiei alcoolice, arătând că glucoza este fermentată la etanol şi CO_2, conform ecuaţiei clasice:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 .$$

Calea de degradare este calea Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) până la acid piruvic. Acesta este decarboxilat de către piruvat-decarboxilaza din drojdie la acetaldehidă, care este redusă de către alcooldehidrogenaza din drojdie la alcool etilic. Reducerea se face cu $NADH_2$ format în cursul glicolizei, în etapa oxidării gliceraldehid-3-fosfatului la acid 1-3-difosfogliceric. Bilanţul energetic al fermentaţiei alcoolice este de două molecule de ATP pentru fiecare moleculă de glucoză fermentată (Fig. 11).

Randamentul practic maxim al fermentaţiei alcoolice este de 90-95% faţă de cel teoretic. Explicaţia este că o parte din substanţele nutritive sunt consumate pentru sinteza de biomasă nouă şi pentru alte reacţii ale celulei. În plus, în fermentaţia alcoolică se formează şi produşi secundari, care duc la consumul de 4-5 % din substratul total. Dacă aceste reacţii secundare sunt eliminate, rezultă un plus de 2,7 % randament de etanol, faţă de glucidele consumate.

2. Produşii secundari ai fermentaţiei alcoolice

În afara produşilor principali, în fermentaţia alcoolică se mai formează, în cantitate mică şi o serie de produşi secundari ca: glicerină, acid lactic, acid acetic, acid citric, acid succinic, acetoină (acetilmetilcarbinol), diacetil, 2-3-butandiol, alcooli superiori şi esteri.

Glicerina (glicerolul) ia naştere în faza incipientă a fermentaţiei alcoolice, când acetaldehida lipseşte din mediu, sau este în concentraţie prea mică şi, ca acceptor de hidrogen de la $NADH+H^+$ funcţionează dihidroxiacetonfosfatul (Fig. 12).

Acidul lactic ia naştere prin reducerea acidului piruvic, care scapă decarboxilării, sub acţiunea enzimei lactat-dehidrogenaza:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH \xrightarrow[\text{lactat-dehidrogenaza}]{NADH+H^+\ NAD} CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH$$

Acid piruvic — Acid lactic

Acidul acetic ia naştere prin oxidarea acetaldehidei, în condiţiile pătrunderii unei mici cantităţi de oxigen în mediu; cantitatea sa este mai mare la începutul fermentaţiei.

Acidul citric ia naştere prin ciclul Krebs. Formarea acetil-CoA nu este condiţionată strict de condiţii de aerobioză, iar acidul oxalacetic se poate forma în anaerobioză în cantităţi nelimitate, dacă este consumat prin diferite reacţii.

Acidul succinic ia naştere prin funcţionarea reductivă a ciclului Krebs: carboxilarea acidului piruvic cu formare de acid oxalacetic, reducerea acestuia la acid malic, deshidratarea acidului malic la acid fumaric şi reducerea acestuia la acid succinic (Fig. 9).

Acetoina (acetilmetilcarbinolul) şi diacetilul se intâlnesc în perioada de mijloc a fermentaţiei alcoolice; spre sfârşitul fermentaţiei aceşti compuşi dispar, datorită conversiei lor în 2-3 butandiol. Formarea acetoinei presupune mai întâi decarboxilarea a două molecule de acid piruvic cu participarea tiaminpirofosfatului (TPP), coenzima decarboxilazei, urmată de condensarea a două molecule de acetaldehidă cu formarea acetoinei, sub acţiunea carboligazei din drojdie (Fig. 13). Diacetilul se formează apoi prin oxidarea acetoinei. Este de remarcat faptul că numai la drojdii se formează acetoina în modul arătat mai înainte, deoarece numai drojdiile posedă carboligază; la bacterii, care nu posedă carboligază, formarea acetoinei are loc în alt mod (vezi Fig. 9 şi fermentaţia lactică).

2-3-Butandiolul (2-3-Butilen-glicolul) ia naştere din acetoină printr-o reacţie de oxidoreducere, catalizată de dehidrogenazele din drojdie, cu participarea $NADH+H^+$:

$$CH_3\text{-}CHOH\text{-}CO\text{-}CH_3 + NADH+H^+ \longrightarrow CH_3\text{-}CHOH\text{-}CHOH\text{-}CH_3 + NAD^+$$

Alcoolii superiori formează ceea ce se numeşte uleiul de fuzel ce este un amestec de: alcool izoamilic, care se află în cantitatea cea mai mare, urmat de: alcool izobutilic şi alcool amilic optic activ. În cantităţi mici se mai găsesc: alcool n-butilic, alcool butilic secundar, alcool n-propilic, alcool n-hexilic, tirozol (alcool p-hidroxi-fenil-etilic), triptofol (alcool β-indolil-etilic) şi alcool fenetilic (alcool feniletilic).

Formarea alcoolilor superiori este strâns legată de metabolismul aminoacizilor la drojdii. Aceşti alcooli pot să derive catabolic din aminoacizii din mediu, sau anabolic, din sursa de carbon principală, pe căile de biosinteză ale aminoacizilor, α-cetoacizii fiind intermediari cheie în ambele cazuri, fapt demonstrat folosind compuşi cu C^{14}.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

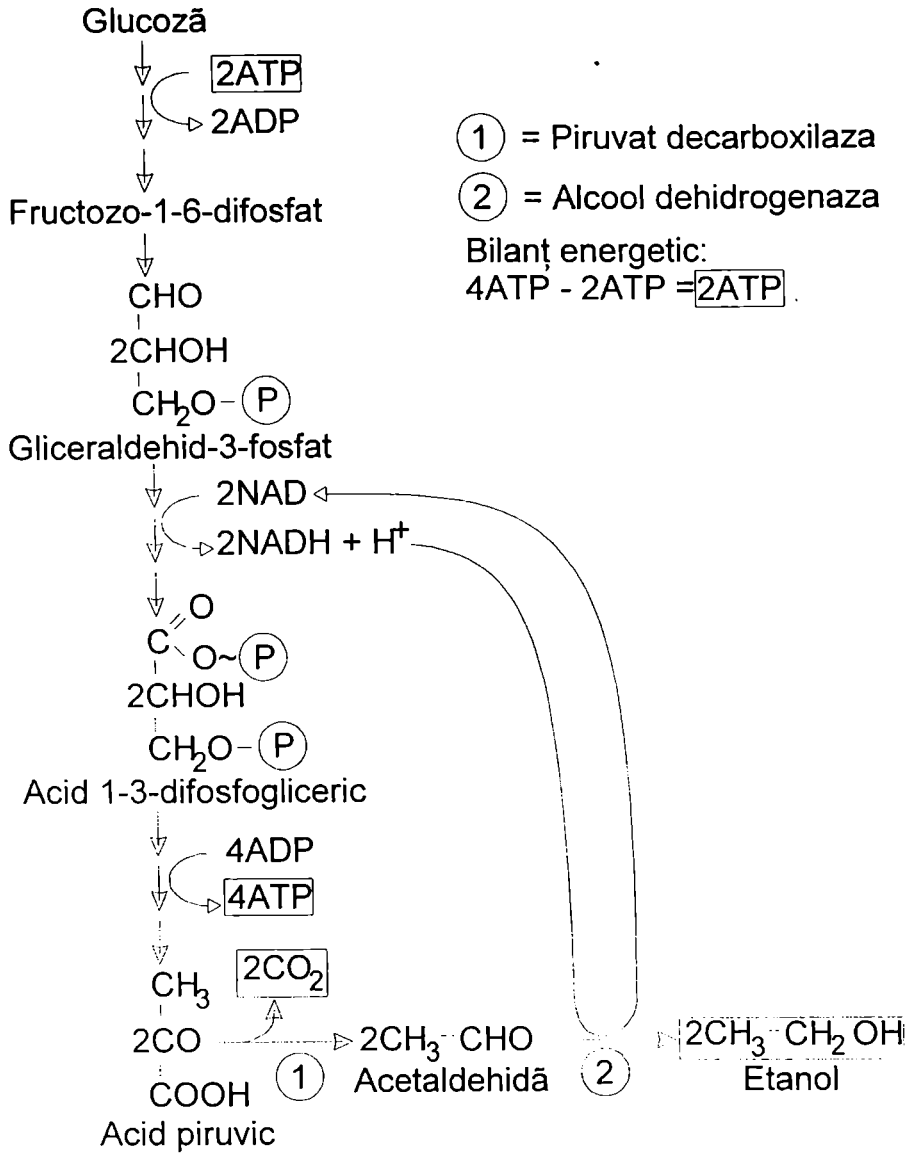
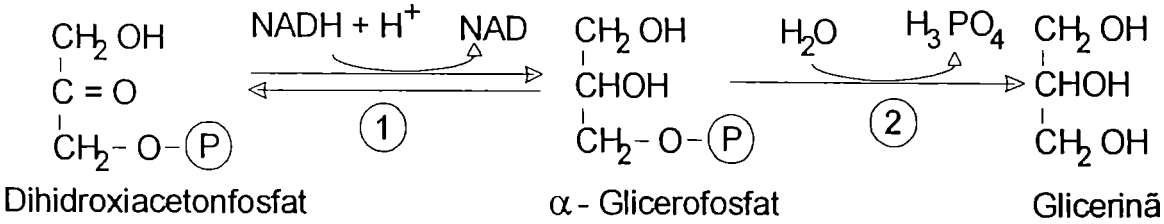


Fig. 11. Biochimia fermentației alcoolice cu formarea produşilor principali de fermentație



1 = α - glicerofosfat - dihidrogenaza

2 = fosfoesteraza

P = rest de fosfat (- PO_3H_2)

Fig. 12. Formarea glicerinei in fermentatia alcoolicã

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

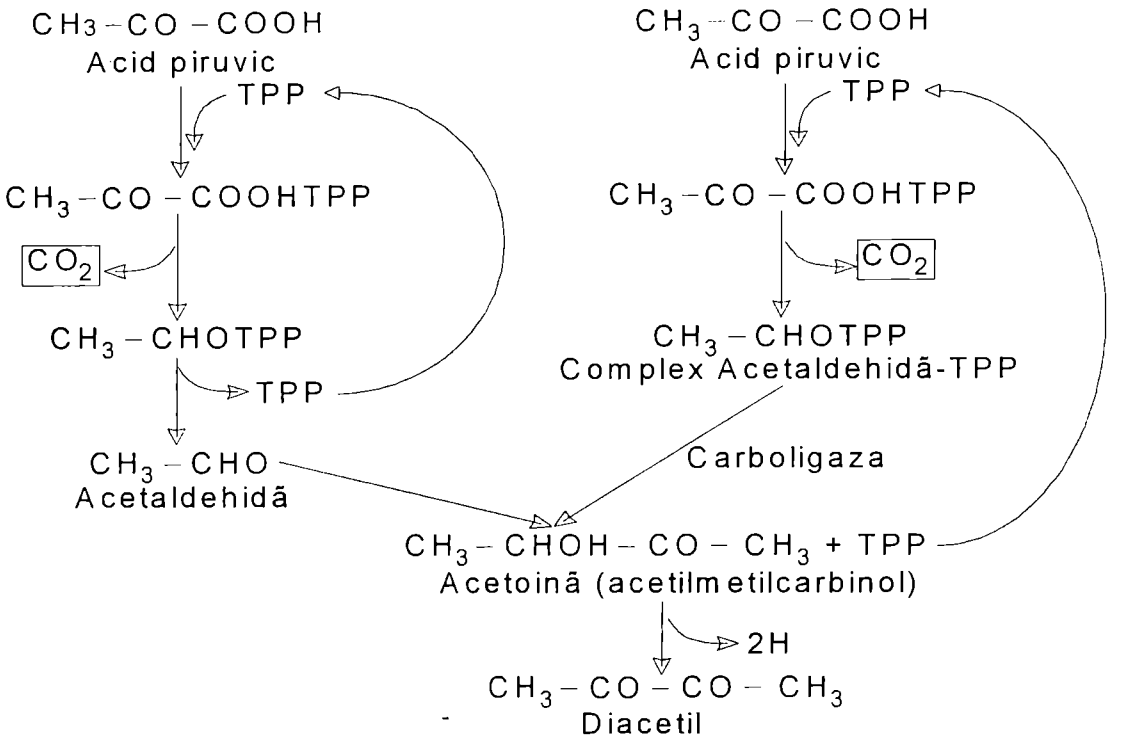


Fig. 13. Formarea acetoinei si diacetilului in fermentatia alcoolicã.

Modalitatea catabolică de formare a alcoolilor superiori se întâlneşte atunci când în mediul de cultură sursa de azot e reprezentată de aminoacizi şi are loc printr-o secvenţă de reacţii cunoscută sub numele de mecanismul Ehrlich:

1) Aminoacid + Acid α-cetoglutaric $\xrightarrow{\text{transaminază}}$ α-Cetoacid + Acid glutamic
(din mediu)

2) α-Cetoacid $\xrightarrow{\text{decarboxilază}}$ Aldehidă + CO_2

3) Aldehidă + $NADH+H^+$ $\xrightarrow{\text{dehidrogenază}}$ Alcool superior + NAD

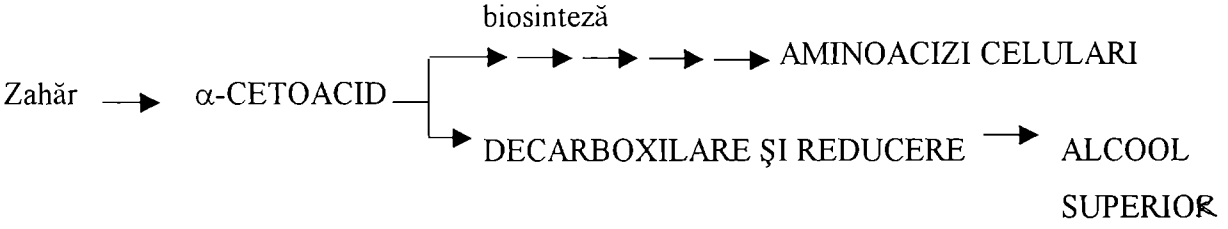
Decarboxilarea α-cetoacidului este realizată de piruvat-decarboxilaza din drojdie, iar reducerea aldehidei de alcooldehidrogenaza din drojdie. Ambele aceste enzime au o specificitate largă, astfel că ele pot decarboxila şi respectiv reduce nu numai acidul piruvic şi respectiv acetaldehida, ci orice α-cetoacid, respectiv orice aldehidă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Astfel, conform mecanismului Ehrlich se pot obţine:

- de la leucină ⟶ alcool izoamilic (3-metil-butanol)
- de la valină ⟶ alcool izobutilic (2-metil-propanol)
- de la izoleucină ⟶ alcool amilic optic activ (2-metil-butanol)
- de la tirozină ⟶ alcool p-hidroxi-fenil-etilic (tirozol)
- de la triptofan ⟶ alcool β-indolil-etilic (triptofol)
- de la fenilalanină ⟶ alcool feniletilic (fenetil alcool)

Modalitatea anabolică de formare a alcoolilor superiori, presupune sintetizarea de către drojdie, pornind de la un zahăr, a alcoolilor superiori respectivi, pe calea de biosinteză a aminoacizilor. Această modalitatea se întâlneşte în cazul în care, în mediu, lipsesc aminoacizii precursori ai acestor alcooli, conform teoriei Ehrlich. În acest caz, alcoolii superiori provin în majoritatea cazurilor din cetoacizi intermediari ai sintezei aminoacizilor. Cea mai mare parte a acestor cetoacizi iau calea de sinteză a aminoacizilor celulari, dar o mică parte este decarboxilată şi redusă la alcool superior:



Temperatura influenţează formarea alcoolilor superiori, efectul ei fiind diferit în funcţie de modalitatea de formare. Astfel, calea biosintetică este mai dependentă de temperatură decât cea catabolică, în special pentru componentul principal, alcoolul izoamilic. Viteza maximă de formare a alcoolilor superiori se situează în jur de 28 °C, adică temperatura la care şi viteza de fermentaţie şi de creştere sunt maxime.

Alcoolii superiori joacă un rol important în gustul băuturilor alcoolice. Astfel, alcoolii izoamilic, izobutilic şi amilic optic activ apar în cantităţi mari în whisky. Alcoolul feniletilic apare în cantităţi mari în whisky Bourbon.. Romul de Jamaica conţine cantităţi mari de alcool izobutilic, alcool butilic secundar şi alcool n-propilic. Alcoolii superiori se găsesc şi în vin şi bere. Vinurile de Porto conţin cantităţi mari de alcool izoamilic. În vin se mai găsesc de asemenea: alcool feniletilic, tirozol şi triptofol. Berea conţine cantităţi mari de alcool izoamilic şi amilic optic activ, precum şi cantităţi mai mici de alcool feniletilic, tirozol şi triptofol.

Esterii iau naştere în timpul învechirii vinului, coniacului şi altor băuturi alcoolice,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

din alcool etilic şi alcoolii superiori, care se esterifică cu acizii existenţi. Esterii formaţi contribuie la formarea buchetului vinului, coniacului şi altor băuturi alcoolice. Asemenea esteri se formează şi în bere. Cel mai important ester din bere şi din alte băuturi alcoolice este acetatul de etil, urmat în cantităţi mai mici de acetatul de butil şi acetatul de izoamil.

În ceea ce priveşte mecanismul esterificării, se consideră că esterificarea directă

$$R\text{-}COOH + R'\text{-}OH \rightleftharpoons R\text{-}COOR' + H_2O$$

decurge foarte încet la temperatura şi valoarea pH la care se prepară şi se păstrează berea şi vinul şi că esterii se formează din compuşi acil-CoA şi alcooli:

$$R\text{-}CO\sim SCoA + R'\text{-}OH \rightleftharpoons R\text{-}COOR' + CoA\sim SH$$

Formarea compuşilor acil-CoA are loc în prezenţa ATP:

$$R\text{-}COOH + ATP + CoA\sim SH \longrightarrow R\text{-}CO\sim SCoA + AMP + PPi + H_2O$$

în care: PP_i = pirofosfat.

3. **Formele fermentaţiei alcoolice**

Alcoolul etilic şi CO_2 sunt produşi principali ai fermentaţiei alcoolice în cazul în care fermentaţia decurge la pH acid (<6). Aceasta este de fapt **forma de bază**, obţinuită, a fermentaţiei alcoolice. Neuberg a arătat că dacă fermentaţia alcoolică este condusă în prezenţa sulfitului, sau în mediu alcalin, se acumulează glicerină. În prezenţa sulfitului, acetaldehida formată se combină cu acesta dând un compus stabil. În aceste condiţii, acetaldehida nu mai poate funcţiona ca acceptor de hidrogen de la $NADH_2$, locul ei fiind luat de dihidroxiacetonfosfat, care este redus la glicerofosfat şi defosforilat la glicerină, conform ecuaţiei:

$$C_6H_{12}O_6 + H_2SO_3 \longrightarrow \underset{\text{Glicerină}}{CH_2OH\text{-}CH(OH)\text{-}CH_2OH} + CO_2 + \underset{\text{Aldehidă hidroxisulfonată (compus stabil)}}{CH_3\text{-}C(H)(OH)\text{-}SO_3H}$$

Aceasta reprezintă **a doua formă a fermentaţiei alcoolice, a lui Neuberg**, iari procedeul a fost industrializat în timpul primului război mondial, în Germania, pentru obţinerea glicerinei necesare fabricilor de armament. Concentraţia de sulfit adăugată în mediu este de 3-4 %, iar randamentul de glicerină reprezintă 30 % din zahărul folosit. Procedeul prezintă unele dezavantaje, deoarece sulfitul de sodiu fiind toxic, este nevoie de adaptarea prealabilă a drojdiei pe acesta şi, pe de altă parte, separarea glicerinei din mediu decurge cu greutate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

De aceea, s-a recurs la alt procedeu pentru obţinerea glicerinei pe cale fermentativă şi anume, conducerea fermentaţiei în medii alcaline, prin adăugare de carbonat de sodiu în concentraţie de 5 %. Acest procedeu a fost descoperit tot de Neuberg şi reprezintă **a treia formă a fermentaţiei alcoolice, a lui Neuberg**. El a arătat că în aceste condiţii, ca acceptor de hidrogen de la $NADH_2$ funcţionează tot dihidroxiacetonfosfatul, rezultând glicerină. Acetaldehida rămasă, suferă o reacţie de dismutare (tip Canizzaro) în etanol şi acid acetic:

$$2C_6H_{12}O_6 + H_2O \xrightarrow{Na_2CO_3} \begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ 2CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{matrix} + 2CO_2 + CH_3\text{-}CH_2OH + CH_3\text{-}COOH$$

Glicerină

1.5. Efectul Pasteur

Prin efect Pasteur se înţelege inhibarea fermentaţiei alcoolice prin oxigen (respiraţie). Inversarea tipului de respiraţie celulară este legată nu numai de scăderea formării de etanol şi CO_2, ci şi de o scădere a consumului de zahăr.

Explicaţia efectului Pasteur se bazează pe cunoaşterea proprietăţilor enzimelor alosterice şi a rolului decisiv pe care îl joacă în acest proces, starea de încărcare energetică a celulei, notată cu E.C. (*energy charge*) şi definită de ecuaţia următoare:

$$E.C. = \frac{2[ATP] + 0{,}5[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

În condiţii anaerobe, prin fermentaţia alcoolică se obţine puţin ATP pe molecula de glucoză consumată. Pentru menţinerea aprovizionării cu energie a celulei este necesar un consum crescut de glucoză. Raportul ATP la AMP este mic (Fig. 14). La pătrunderea oxigenului are loc o puternică formare de ATP prin fosforilare oxidativă în catena de respiraţie celulară şi ca urmare, raportul ATP la AMP este mare, deci, încărcarea energetică (E.C.) a celulei creşte (Fig. 14).

Enzima alosterică cheie a metabolizării glucozei este fosfofructokinaza, prima enzimă specifică a căii EMP. Ea catalizează fosforilarea fructozo-6-fosfatului la fructozo-1-6 difosfat cu ajutorul ATP (Fig. 14). Fosfofructokinaza este inhibată alosteric prin ATP. Această inhibiţie *feed-back* are drept rezultat creşterea concentraţiei de glucozo-6-fosfat în celulă, pe baza reversibilităţii reacţiei precedente (fosfo-glucozo-izomeraza). Glucozo-6-fosfatul provoacă o inhibiţie alosterică a hexokinazei, inclusiv a sistemului de pătrundere a glucozei în celulă, ceea ce duce la o scădere a consumului de glucoză. Activitatea fosfofructokinozei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

este inhibată şi de citrat. Prin acest al doilea efector negativ, acţiunea inhibitoare a ATP este întărită (Fig. 14).

În timp ce ATP inhibă alosteric fosfofructokinaza, AMP provoacă activarea ei. O încărcare energetică mai mică, aşa cum se întâmplă în fermentaţie, favorizează de aceea pătrunderea în celulă şi metabolizarea glucozei (Fig. 14).

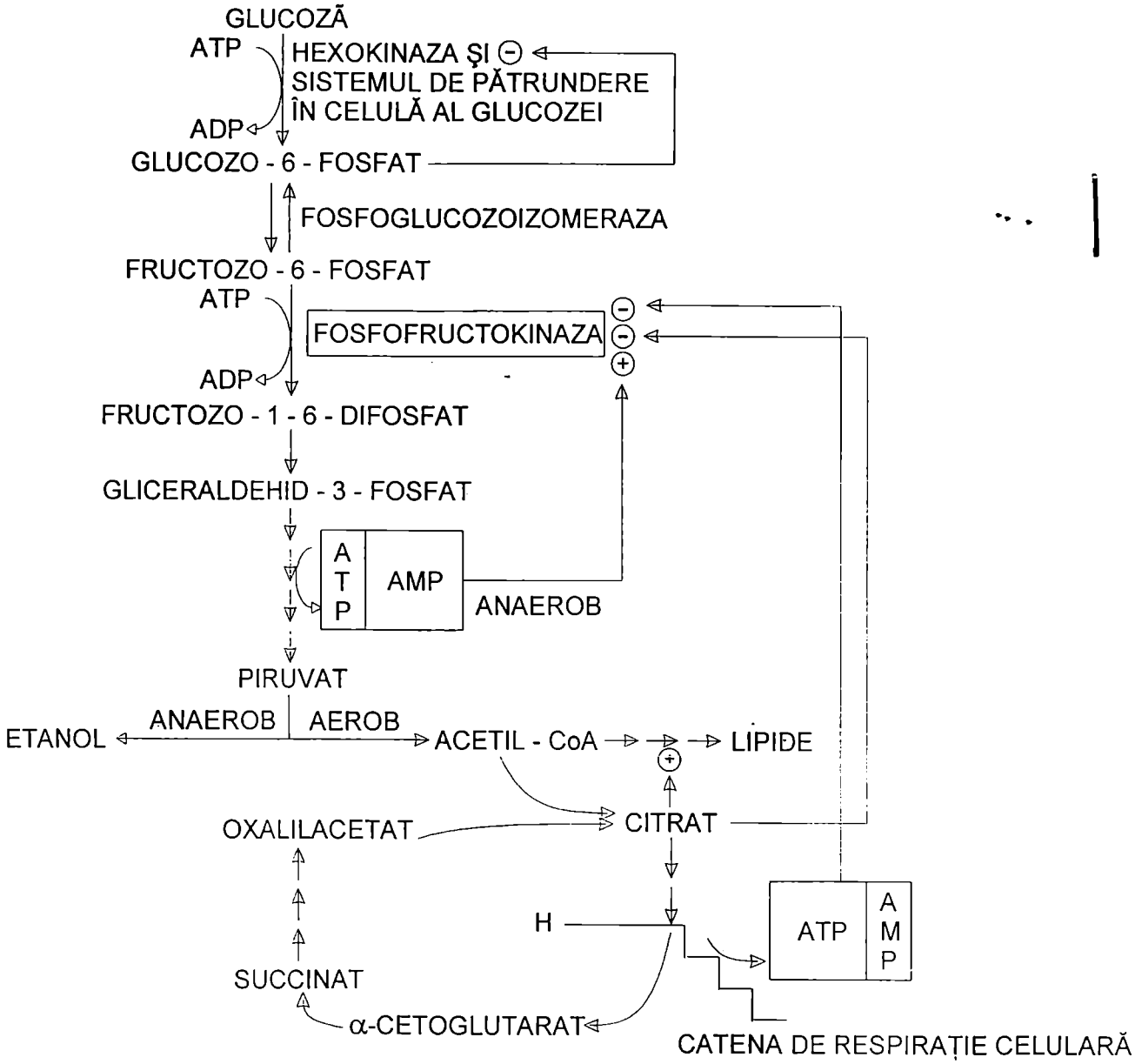


Fig. 14. Reactiile principale ale reglării enzimelor alosterice în efectul Pasteur

⟶⊖ = efector cu funcție de inhibare

⟶⊕ = efector cu funcție de activare

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Corelată cu efectul Pasteur este şi formarea substanţelor de rezervă la drojdie. Glucozo-6-fosfatul, acumulat la concentraţii crescute de ATP, este transformat printr-o reacţie de izomerizare în glucozo-1-fosfat. Acesta intră ca piatră de construcţie în sinteza glicogenului şi în acelaşi timp, activează procesul de sinteză. Citratul activează acetil-CoA carboxilaza, enzima care iniţiază sinteza acizilor graşi (Fig. 6).

La speciile de drojdii care acumulează o cantitate mare de lipide (*Rhodotorula sp.*, *Geotrichum sp.*) fosfofructokinaza lipseşte. La aceste organisme glucoza este degradată pe calea pentozofosfaţilor. Prin aceasta, lipseşte ventilul care controlează pătrunderea glucozei în celulă. Pătrunderea necontrolată a glucozei face posibilă formarea intensă de lipide.

1.6. Efectul Crabtree

La concentraţii mari de glucoză, *S. cerevisiae* fermentează şi în condiţii aerobe. Această inhibare a respiraţiei prin glucoză a fost observată prima dată de Crabtree în tumori şi a fost numită efect Crabtree, sau fermentaţie aerobă. În realitate, este vorba de o represie prin catabolit a sintezei enzimelor implicate în respiraţie şi este realizată nu numai de glucoză, ci de orice sursă de carbon rapid metabolizabilă.

În legătură cu efectul Crabtree s-a stabilit modelul fiziologic al creşterii drojdiei în aerobioză. Conform acestuia creşterea drojdiei *S. cervisiae* comportă faze diferite după modul de cultivare.

În cultură discontinuă se observă o primă fază de creştere pe glucoză cu producere de etanol. Această fază primă este consecinţa efectului Crabtree, caracteristic drojdiilor în prezenţa unui exces de glucoză. Apoi, după o scurtă fază de latenţă, drojdia efectuează a doua fază de creştere, reconsumând etanolul. Este ceea ce numim respiraţia etanolului.

În condiţii de cultivare continuă, concentraţia de glucoză fiind mică, este în întregime transformată în noi celule, fără acumulare de etanol. Este ceea ce numim respiraţia glucozei. La concentraţii de glucoză mai ridicate, care depăşesc concentraţia critică a efectului Crabtree glucoza este din nou fermentată cu producere simultană de biomasă şi etanol. Pe această bază, modelul fiziologic al creşterii drojdiei *S. cervisiae* în aerobioză distinge următoarele trei stări limită:

Starea 1: fermentaţia glucozei. În această stare drojdia se dezvoltă pe glucoză cu producere simultană de biomasă şi etanol.

Starea 2: respiraţia glucozei. Glucoza este în totalitate utilizată pentru producţia de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

noi celule.

Starea 3: respiraţia etanolului. Drojdia reconsumă etanolul pentru sinteza de noi celule.

1.7. Factorii care influenţează fermentaţia alcoolică

Factorii care influenţează fermentaţia alcoolică sunt: cantitatea şi calitatea inoculului, concentraţia de zahăr a mediului, sursa de azot, sărurile minerale şi diverse metale, factorii de creştere, concentraţia de alcool format, valoarea pH, temperatura, aerarea şi floculareа.

Cantitatea şi calitatea inoculului

Există o anumită proporţionalitate între cantitatea de drojdie şi viteza de fermentaţie. Acest fapt este de mare importanţă practică. La fabricarea berii, de exemplu, cu cât cantitatea de drojdie este mai mare, cu atât şi cantitatea de CO_2 va fi mai mare. Pentru fermentaţia alcoolică se însămânţează de obicei, în proporţie de 1 g drojdie la 100 ml mediu. Vârsta drojdiei, utilizata ca inocul, are de asemenea importanţă, intensitatea fermentaţiei fiind cu atât mai mare, cu cât drojdia este mai tânără.

Concentraţia de zahăr

Viteza de fermentaţie creşte proporţional cu concentraţia de zahăr, până la valoarea de 12 %, după care rămâne constantă. Peste concentraţia de 20 % zahăr, viteza de fermentaţie şi cantitatea de alcool formată scad foarte mult. Există însă variaţii considerabile în funcţie de specie şi chiar de tulpină. Drojdiile folosite în vinificaţie, de exemplu, fermentează rapid glucoza şi fructoza, chiar la concentraţii de 20-25 %, iar fructoza este fermentată bine şi la concentraţii mai mari.

Sursa de azot

Drojdiile se pot dezvolta bine folosind ca unică sursă de azot sărurile de amoniu (azot mineral). În ceea ce priveşte azotul organic, drojdiile se dezvoltă bine pe aminoacizi şi folosesc mai puţin peptidele, cel mult peptidele cu greutate moleculară mică.

Săruri minerale şi diverse metale

Sărurile metalelor, în concentraţii mici, stimulează fermentaţia, iar în concentraţii mari o împiedică. De exemplu, KCl în concentraţie de 0,005 % stimulează fermentaţia; potasiul poate fi înlocuit cu NH_4^+ cu acelaşi efect. Ca^{2+} şi PO_4^{3-} au acelaşi efect stimulator. Excesul de Fe^{2+}, Ca^{2+} (la 9 mg/l), Al^{3+} (la 25 mg/l) inhibă fermentaţia.

Factorii de creştere

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Majoritatea speciilor de drojdii sunt capabile să-şi sintetizeze toţi factorii de creştere necesari. Unele specii din genul *Schizosaccharomyces* necesită acid nicotinic, acid pantotenic şi mezoinozitol.

Interesante sunt studiile făcute asupra rolului tiaminei, care constituie sub formă de TPP (tiaminpirofosfat) coenzima carboxilazei. În fermentaţia alcoolică interesează atât conţinutul în tiamină al drojdiei, cât şi cel al mediului de cultură.

Pentru drojdiile cu conţinut mic de tiamină, adăugarea acesteia în mediu în concentraţii cuprinse între 50 şi 100 μg/l determină mărirea vitezei de fermentaţie.

Pentru drojdiile cu conţinut ridicat de tiamină, adăugarea acesteia în mediu, sau nu modifică viteza de fermentaţie, sau chiar o diminuează.

Concentraţia de alcool format depinde în primul rând de tipul de drojdie folosit în fermentaţie. Astfel, drojdiile de fermentaţie inferioară tolerează concentraţii mai mici de alcool, deoarece ele şi produc mai puţin alcool. Drojdiile de fermentaţie superioară tolerează concentraţii mai mari de alcool, deoarece ele şi produc cantităţi mai mari de alcool. În general, cantitatea maximă produsă de etanol variază între 11 şi 17 %. De la o anumită concentraţie, alcoolul etilic exercită o acţiune de inhibare atât asupra dezvoltării celulare, cât şi asupra producţiei de etanol. Inhibarea produsă de etanol este totuşi mai pronunţată asupra creşterii celulare, decât asupra producţiei de etanol şi anume: etanolul inhibă creşterea de la concentraţia de 8,7 g %, iar producţia de etanol de la concentraţia de 11,5 g %. Totuşi drojdiile folosite în vinificaţie se dezvoltă şi la concentraţii de 17-18 g % alcool.

Producerea etanolului, excretarea lui din celula de drojdie şi reglarea acestui proces nu sunt clare în întregime. Studii recente au arătat totuşi că acest fenomen este strict legat de concentraţia în glucide a mediului, deoarece presiunea osmotică crescută a mediului, determinată de concentraţii ridicate de substrat glucidic (peste 10% greutate/volum) întârzie excreţia etanolului din celula de drojdie. Concentraţiile crescute de etanol intracelular devin toxice pentru celula de drojdie şi astfel reduc viabilitatea acesteia, ducând la o eventuală reducere a ratei de fermentaţie. Evitarea acestui inconvenient se face prin modificarea condiţiilor de alimentare cu substrat în timpul fermentaţiei. Din acest punct de vedere, metodele de cultivare continuă sunt mai adecvate acestui scop, deoarece presupun alimentarea continuă cu mediu proaspăt, având o concentraţie în glucide (deci presiune osmotică) convenabilă, cu menţinerea constantă a densităţii celulare, prin îndepărtarea concomitentă a unui volum similar de suspensie celulară.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În plus, există şi observaţii privind faptul că toleranţa la etanol a unor tulpini de drojdii este mult dependentă de compoziţia în acizi graşi a membranei plasmatice, în sensul că această compoziţie favorizează sau inhibă excreţia de etanol.

Valoarea pH

Cantitatea cea mai mare de alcool etilic se obţine între pH = 3,0 şi pH = 5,0, cu un optimum cuprins între 4,0 şi 5,0. La pH = 7,0 cantitatea de alcool etilic scade simţitor şi creşte în schimb cea de produşi secundari: glicerină, acid acetic, acid lactic.

Temperatura optimă este cuprinsă între 20 °C şi 30 °C. La 0 °C fermentaţia este foarte lentă, iar peste 30 °C se produc efecte inhibitoare.

Aerarea

Fermentaţia alcoolică constă din două faze diferite care se suprapun: faza de creştere şi faza de fermentaţie. În faza de creştere, micile cantităţi de oxigen care se află dizolvat în mediu, sau care pătrund în vasele de fermentaţie deschise, în special la partea superioară a mediului, asigură multiplicarea drojdiei.

În faza de fermentaţie, oxigenul trebuie să lipsească complet pentru a asigura transformarea cantitativă a zahărului în etanol. Anaerobioza necesară acestei faze este creată atât de CO_2 care începe să se formeze, cât şi de conducerea fermentaţiei în vase închise. Cele două faze se suprapun, pentru că multiplicarea drojdiei continuă până la jumătatea fazei de fermentaţie, dar majoritatea zahărului este transformat în etanol.

Floculareа este fenomenul în care, celulele de drojdie aderă unele de altele în grămezi, tinzând să sedimenteze rapid din mediul în care sunt suspendate. În funcţie de momentul în care are loc, floculareа poate fi un lucru de preţ, sau dimpotrivă, de nedorit. Floculareа care are loc aproape de sfârşitul fermentaţiei în fabricile de bere este preţioasă, servind la limpezirea berii. Dacă însă, floculareа are loc prea devreme, sau prea uşor, fermentarea mustului este incompletă. În acest caz, agitarea este necesară pentru remedierea situaţiei. În panificaţie, sedimentarea prea rapidă a celulelor de drojdie din suspensia apoasă preparată pentru încorporarea în aluat este de nedorit. Pe baza capacităţii lor de floculare, drojdiile se clasifică în 4 clase:

- clasa I-a: cuprinde drojdiile care nu floculează şi care sunt complet dispersate, în timpul tuturor stadiilor de fermentare;
- clasa a II-a: cuprinde drojdiile care floculează spre sfârşitul fermentaţiei, în grămezi mici, afânate;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- clasa a III-a: cuprinde drojdiile care floculează spre sfârşitul fermentatiei, în grămezi dense, compacte;
- clasa a IV-a: cuprinde drojdiile care floculează la începutul fermentaţiei;

Flocularea are loc numai când cultura se află în faza staţionară de creştere; celulele în faza logaritmică de creştere nu floculează, adică, flocularea are loc numai în absenţa diviziunii celulare.

Cu privire la mecanismele care stau la baza acestui fenomen s-au emis diferite ipoteze. Cea mai plauzibilă este aceea că flocularea este determinată de structura şi compoziţia chimică a peretelui celular al drojdiei, respectiv de componenta manan-proteină şi în special de raportul între mananul şi proteina din peretele celular al drojdiei. Că lucrurile stau astfel o dovedesc următoarele fapte:

- un conţinut minim de manan corespunde cu o maximă floculare;
- perioada de defloculare poate fi eliminată prin creşterea drojdiei în prezenţă de FNa, un inhibitor al sintezei mananului pe calea fosfoglucomutazei;
- o floculare rapidă are loc când mananul este dizolvat prin tratarea drojdiei cu alcali.

Cercetări realizate cu ajutorul microscopiei electronice au pus în evidenţă faptul că celulele de drojdie care floculează sunt acoperite cu nişte protuberanţe asemănătoare fimbriilor de la bacterii, pe când celulele care nu floculează sunt lipsite de asemenea protuberanţe, suprafaţa celulei lor fiind netedă.

Flocularea este o caracteristică ereditară, fiind controlată genetic. Datorită acestui fapt, diferiţi factori de mediu influenţează numai proporţia de floculare, nu şi existenţa acestei proprietăţi. Printre aceşti factori amintim:

- glucidele fermentescibile împiedică flocularea;
- Ca^{2+} este esenţial pentru floculare, efectul său fiind antagonist cu cel de Na+. Este o părere unanim admisă că flocularea la drojdii implică formarea de punţi între ionii de calciu şi grupările carboxil din proteinele peretelui celular.

S-a mai stabilit de asemenea, că între drojdiile care nu floculează şi cele care floculează există şi deosebiri de ordin enzimatic şi anume: toate enzimele ciclului glicolizei, cu excepţia alcool-dihidrogenazei şi majoritatea enzimelor ciclului Krebs, au o activitate mai mare la drojdiile care nu floculează, faţă de cele care floculează. Aceasta şi explică fermentaţia rapidă şi mai completă realizată de drojdiile care nu floculează.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1.8. Etanol din sisteme de celule imobilizate

În industria fermentativă, utilizarea tehnicilor de imobilizare, în special a celulelor întregi a câştigat repede teren faţă de metodele tradiţionale. Motivul este beneficiul asupra producţiei de etanol, constatat prin imobilizare. Materialele folosite sunt perle de alginat de Na, sau de Ca, sau coloană de K-carrageenan. Cel mai important avantaj al sistemelor de celule imobilizate este posibilitatea de a obţine o mare productivitate la rate de creştere care depăşesc rata maximă (μ_{max}) de creştere a microorganismului.

Există mai multe teorii care încearcă să explice capacitatea de fermentaţie crescută a microorganismelor ca rezultat al imobilizării.

Un prim fapt este acela că se micşorează inhibiţia prin produsul final, datorită reducerii concentraţiei de etanol în micromediul înconjurător imediat al microorganismului, ca urmare a formării unui strat protector, sau a adsorbţiei specifice a etanolului de către suport.

În al doilea rând, inhibiţia prin substrat poate fi şi ea diminuată, dacă rata de fermentaţie atinge, sau depăşeşte rata de difuzie a glucozei în celulă.

În al treilea rând, alterarea membranei celulare în timpul procesului de imobilizare, determină un transfer îmbunătăţit al substratului în interiorul celulei microbiene şi o ieşire în afară a produsului final.

Influenţa unor factori asupra fermentaţiei alcoolice în sisteme de celule imobilizate se modifică faţă de fermentaţia alcoolică în sisteme libere. Exemplele cele mai caracteristice din acest punct de vedere sunt temperatura şi valoarea pH.

Astfel, în timp ce la celulele libere de *S. cervisiae* se constată o creştere constantă a ratei de producţie a etanolului cu creşterea temperaturii de la 25 °C la 42 °C, la celulele imobilizate pe alginat de sodiu se observă un maximum la 30 °C. Temperatura mai scăzută pentru sistemele imobilizate se datoreşte difuziei limitate a etanolului în matricea suportului. La temperaturi mai ridicate, producţia de etanol depăşeşte rata de difuzie a acestuia, astfel că acesta se acumulează în interiorul perlelor matricei. Atingerea unor niveluri inhibitoare determină apoi declinul observat în rata producţiei de etanol.

Diferenţe semnificative apar de asemenea cu privire la efectul valorii pH asupra ratei de fermentaţie. Domeniul îngust al optimului de pH, caracteristic sistemelor libere (pH = 4,0 - 5,0) este înlocuit cu un domeniu extrem de larg (pH = 3,0 - 7,8) după imobilizare. Acest efect

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

provine din gradientul de pH care există în interiorul perlei.

Dacă se face o comparaţie între productivitatea de alcool etilic (exprimată volumetric) a sistemelor libere şi imobilizate se constată că metoda sistemelor imobilizate este superioară celei a sistemelor libere (Tabel 5).

Tabel 5. Productivitatea de etanol la sistemele libere şi imobilizate cu *S. cervisiae* .

Procedeul	Substratul	Productivitate etanol volumetric (g/l/h)
Discontinuu	Melasă	2,8
Continuu (celule libere)	Melasă	3,35
Continuu (celule imobilizate)	Melasă	28,6

1.9. Industrii bazate pe fermentaţia alcoolică

Patru industrii importante sunt bazate pe fermentaţia alcoolică: industria berii, vinificaţia, industria spirtului şi a băuturilor alcoolice distilate şi panificaţia.

1.9.1. Industria berii

Berea este o băutură alcolică fermentată şi nedistilată foarte veche. Era cunoscută la babilonieni şi egipteni, în vechiul Israel, la greci şi romani, la arabi şi la triburile celtice şi germanice. Berea veche totuşi, se făcea fără hamei şi nu avea acelaşi gust cu berea cunoscută astăzi. Introducerea hameiului la fabricarea berii datează din anul 1079 în sudul Germaniei, de unde s-a răspândit în toată Germania, în sec. XIV şi XV. În Anglia, folosirea hameiului a fost adoptată mai târziu, în sec. XVI şi XVII.

Berea, aşa cum o cunoaştem astăzi, se face din malţul uscat de orz, ca şi din alte surse de amidon ca orez sau porumb; apa, hameiul şi drojdia folosită la fermentaţie, constituie restul materiilor prime de bază folosite la fabricarea berii. Producţia mondială de bere depăşeşte în prezent un miliard de hectolitri.

Etapele fabricării berii sunt:

1. Malţificarea este procesul de germinare a orzului, în mod artificial, afară din sol. Malţificarea are loc în camere speciale numite mălţării. În acest scop, boabele de orz sunt muiate 2 zile în apă, după care sunt scoase şi întinse în camere de malţificare, pe duşumea, sau în tambure rotative,unde se lasă pentru germinare 5-7 zile. În acest timp, malţul se întoarce şi este aerat frecvent, pentru realizarea unei germinări uniforme. La sfârşitul acestei perioade germinarea se opreşte prin uscarea malţului în cuptoare, la 80 °C, pentru malţul blond şi la 105 °C pentru malţul brun. După uscare se îndepărtează rădăciniţa şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

tulpiniţa iar malţul uscat se macină, obţinându-se făina de malţ. În timpul malţificării, în bobul de orz au loc procese biochimice importante şi anume, activitatea unor enzime creşte, pe când alte enzime sunt formate de *novo*. Astfel, activitatea β-amilazei creşte, pe când α-amilaza este formată de "*novo*". Alte enzime care se formează de asemenea în cursul malţificării sunt: proteinazele, citazele şi fitazele.

În timpul uscării au loc reacţii de brunificare, formându-se melanoidine, care sunt importante pentru aroma şi culoarea berii.

În prezent se tinde să se înlocuiască malţul de orz cu preparate enzimatice amilolitice microbiene (bacteriene sau fungice), pentru zaharificarea amidonului din cerealele nemalţificate (porumb, orez, etc.) folosite ca adaos la fabricarea berii.

2. Brasajul este o operaţie prin care, substanţele proteice şi amidonul din malţ sunt hidrolizate sub acţiunea enzimelor formate în cursul malţificării. Astfel, amidonul este hidrolizat la maltoză (50-55 %), maltotrioză (10-15 %) şi dextrine, proces care se numeşte zaharificare, iar substanţele proteice sunt hidrolizate la aminoacizi şi peptide. În acest scop, făina de malţ se amestecă cu apă şi se aplică plămezii rezultate, un anumit regim de temperatură, care asigură pe rând, temperaturi optime de acţiune: enzimelor proteolitice (40 °- 45 °C) şi enzimelor amilolitice (57 °- 65 °- 70 °C). Modul cum este condusă temperatura în timpul brasajului, determină proporţia dintre zaharurile fermentescibile şi dextrinele nefermentescibile, ca şi gradul de extensie al proteolizei. Musturile cu un conţinut ridicat de dextrine, care nu pot fi fermentate de drojdii, dau beri cu conţinut scăzut de alcool. Musturile cu conţinut ridicat de zaharuri, dau beri cu conţinut ridicat de alcool.

Gradul de extensie al proteolizei afectează proprietăţile fizice şi stabilitatea berii. La temperatura de transformare de aproximativ 60 °C se formează compuşi azotaţi cu greutate moleculară mare (peptide), care dau gust bun, spumă şi conferă stabilitate spumei.

Operaţia de brasaj se termină cu filtrarea, prin care se obtine mustul de malţ limpede, ce constituie mediul de cultură pentru dezvoltarea drojdiei şi pentru fermentare.

Glucidele fermentescibile din mustul de malţ constituie sursa de carbon a drojdiei; ele sunt reprezentate de: glucoză (10 g/l), zaharoză (4 g/l), fructoză (1 g/l), maltoză, principalul zahăr din must (55-65 g/l) şi maltotrioză (15 g/l). Sursa de azot este reprezentată de aminoacizi ca: acid aspartic şi glutamic, asparagină, glutamină, serină, treonină, lizină, arginină şi prolină. Cu excepţia prolinei, toti sunt folositi de drojdie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3. Fierberea

Mustul de malţ filtrat este fiert apoi aproximativ două ore cu adaos de hamei. Se folosesc inflorescenţe uscate ale plantei femele. Fierberea are drept scop să sterilizeze şi să concentreze mustul, să inactiveze enzimele şi să extragă din hamei răşinile şi uleiurile care conferă berii aroma caracteristică şi gustul amar, împreună cu unele substanţe bactericide, care ajută la prevenirea infecţiilor. Majoritatea proteinelor din must sunt precipitate de taninurile extrase din malţ şi din hameiul fiert şi îndepărtate odată cu hameiul epuizat. În prezent se folosesc în loc de hamei, extracte de hamei în hexan, care conţin răşinile din hamei.

După fierbere şi îndepărtarea hameiului, mustul de malţ este răcit şi transferat aseptic în vasele de fermentaţie.

4. Fermentarea

Drojdia folosită la fabricarea berii este unul din factorii determinanţi ai calităţii berii şi de aceea trebuie să aibă următoarele proprietăţi:

- să producă o fermentaţie viguroasă în must, care să consume substanţele nutritive din acesta şi să împiedice dezvoltarea microorganismelor străine;
- să aibă un grad de floculare corespunzător, care să permită limpezirea berii la sfârşitul fermentaţiei;
- să producă uleiuri de fuzel şi alţi metaboliţi care joacă un rol important în gustul şi aroma berii.

Se foloseşte o drojdie de fermentaţie inferioară, *Saccharomyces carlsbergensis*, provenită din laboratoarele Carlsberg din Copenhaga, Danemarca unde această specie a fost pentru prima dată obţinută în stare pură. Este interesant de remarcat că tulpinile de drojdie folosite în industria berii sunt capabile să utilizeze următoarele glucide, strict în ordinea indicată: zaharoză, glucoză, fructoză, maltoză şi maltotrioză. Acest lucru se explică prin aceea că, odată consumate primele trei glucide, represia prin catabolit a sintezei enzimelor este suprimată şi deci, poate începe utilizarea maltozei şi maltotriozei. Viteza lor de hidroliză depinde de activitatea maltozo- şi maltotriozo-permeazelor şi a maltazei din drojdie. În timpul fermentaţiei drojdia sintetizează două glucide: trehaloza şi glicogenul.

Fermentaţia are loc în două faze: fermentaţia primară şi fermentaţia secundară. Fermentaţia primară (principală) se face fie în vase deschise numite linuri, fie în vase închise, prevăzute cu deschideri pentru eliminarea CO_2 şi durează 8-10 zile la temperatura de 6° -12 °C. În această fază, cea mai mare parte a maltozei este fermentată la alcool etilic şi CO_2. La

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sfârşitul fermentaţiei, drojdia se depune şi berea crudă obţinută se trece la fermentaţia secundară. Aceasta se face în vase perfect închise numite tancuri, la o temperatură de 0,5° -3 °C şi durează 1-6 luni. Este o fermentaţie mai slabă, care se face pe seama maltozei rămase, fără să o epuizeze şi sub acţiunea drojdiei rămase în suspensie. În această etapă, creşte conţinutul în alcool, berea se saturează în CO_2, se limpezeşte şi se formează substanţele care favorizează gustul şi aroma plăcută a berii. Aceste substanţe sunt: alcooli superiori (ulei de fuzel); esteri (acetat de etil sau de izoamil); aldehide şi cetone (acetaldehidă, diacetil); compuşi cu sulf, provenind fie din materiile prime, fie din metabolismul drojdiei şi având rol cheie în aromă (H_2S, dimetilsulfură, mercaptani); acizi organici volatili sau nu; fenol, crezol, vinilfenol.

La sfârşitul fermentaţiei secundare, berea se filtrează şi se distribuie în butoaie sau sticle. Berea din butoaie se vinde nepasteurizată, în timp ce, berea din sticle se pasteurizează 5 minute, la 60 °C, pentru a preveni creşterea ulterioară a drojdiei sau contaminarea cu bacterii lactice. După pasteurizare şi înainte de umplere, berea se saturează cu CO_2 sub presiune.

Principalele tipuri de bere

Berea Lager este berea obţinută după procedeul descris, cu *S. carlsbergensis*, având o aromă uşoară de hamei.

Berea Pilsen, este o bere Lager, obţinută în Cehia la Pilsen, cu o aromă puternică de hamei.

Berea Alé şi **berea Porter** se obţin prin fermentare cu *S. cerevisiae*, la temperaturi mai ridicate. Au un conţinut în alcool mai ridicat şi sunt folosite în special în Anglia şi în unele regiuni din America.

Berea finită are drept constituenţi majori: apă, dextrine (4 %), alcool etilic (3-4 %) şi CO_2 (0,4 %). În cantitate mai mică conţine: zaharuri nefermentate, aminoacizi, acizi organici (acetic, lactic, succinic, citric, caproic, caprilic) şi substanţe care dau aromă. Conţine de asemenea, cantităţi apreciabile de vitamine, în special riboflavină; este însă săracă în tiamină, deoarece driojdia consumă complet această vitamină.

1.9.2. Vinificaţia

Ca şi berea, vinul este o băutură fermentată alcoolic şi nedistilată. Temenul de vin este folosit pentru a descrie un produs al fermentaţiei alcoolice a diverselor sucuri de fructe şi este rezervat în special pentru fermentarea sucului de struguri, numit şi must de struguri.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1. Mustul de struguri

Se folosesc struguri proveniţi din specii cultivate de *Vitis vinifera*, sau *Vitis labrusca*. Strugurii copţi, sunt selectaţi şi zdrobiţi mecanic. Sucul rezultat sau mustul este trecut în vasele de fermentaţie, care sunt din lemn, ciment sau piatră. Unele sunt deschise, altele sunt închise, având deschideri pentru eliminarea CO_2. Pentru obţinerea vinurilor roşii pieliţa strugurilor se lasă în must. Ea conţine substanţe colorante de tipul antocianilor, care sub influenţa alcoolului produs în fermentaţie se solubilizează şi trec în must. Pentru a evita infecţiile cu bacterii acetice, în prezent, se folosesc extracte din pieliţă, obţinute prin fierberea acestora, care se adaugă la mustul separat de pieliţă, înainte de fermentare.

Mustul de struguri are un pH de aproximativ 3,0-3,6, determinat în special de conţinutul său în acizi organici: tartric şi malic, împreună cu puţin acid citric. Conţine 15-25 % glucide fermentescibile, în special glucoză şi fructoză, împreună cu mici cantităţi de pentoze, pentozani, pectine şi inozitol. Conţine de asemenea, azot asimilabil sub formă de aminoacizi, peptide şi purine, precum şi factori de creştere şi săruri minerale. Conţine de asemenea şi taninuri, care la vinurile roşii sunt în cantitate mai mare decât la cele albe datorită extracţiei din pieliţă. Mustul de struguri este deci un bun mediu de cultură pentru organismele acido-tolerante.

2. Drojdia folosită

Pe pieliţa boabelor de struguri se găseşte o microbiotă variată, formată din: drojdii, mucegaiuri şi bacterii. Nu toate aceste microorganisme sunt capabile să crească în mustul de struguri, ci numai drojdiile de vin, care sunt tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Acestea se deosebesc de *S. cerevisiae*, prin forma mai eliptică a celulei lor şi printr-o proprietate particulară şi anume: insensibilitatea la SO_2 adăugat în must. Într-adevăr, în must, înainte de fermentare, se adaugă SO_2, bisulfit, sau metabisulfit (aproximativ 100 ppm) cu scopul de a realiza sterilizarea lui parţială prin omorârea microorganismelor, cu excepţia lui *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*.

Fermentaţia alcoolică se poate face spontan, cu drojdia care a supravieţuit în urma tratamentului cu sulf, sau se adaugă în mustul tratat, tulpini selecţionate de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Inoculul se prepară în laborator şi se adaugă în proporţie de 1-3 % V/V.

Tulpinile selecţionate pentru caracteristicile lor oenologice trebuie să răspundă la o serie de criterii şi anume:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- capacitatea de a fermenta rapid şi la temperatură joasă cantităţi importante de glucoză şi fructoză;
- rezistenţa la alcool etilic, fermentaţia decurgând în prezenţa unor cantităţi însemnate de alcool etilic;
- rezistenţa la acţiunea SO_2;
- randamentul lor alcoolic, randamentul mediu fiind de 1 ° alcool etilic pentru 17 g zahăr fermentat;
- rezistenţa lor la factorul Killer, pentru că ele se vor confrunta cu o populaţie de drojdii sălbatice importantă, dintre care unii reprezentanţi pot elimina aceast factor;
- acţiunea lor sinergică sau inhibitoare faţă de bacteriile lactice, atunci când o fermentaţie secundară malolactică este indicată.

3. Fermentarea decurge în trei faze:

- faza iniţială de multiplicare, care durează 3-4 zile, în cursul căreia mustul se tulbură şi începe o slabă degajare de CO_2;
- faza de fermentaţie zgomotoasă, care durează 6-14 zile şi se caracterizează printr-o degajare abundentă de CO_2;
- faza de fermentaţie lentă, care durează 5-6 săptămâni şi se realizează cu degajare slabă de CO_2, deoarece procesele biologice sunt încetinite ca urmare a alcoolului acumulat.

În general, durata de fermentaţie depinde de toleranţa în alcool a drojdiei folosite şi de concentraţia de zahăr din must. Majoritatea vinurilor de masă au un conţinut în alcool de 10 %, astfel încât, majoritatea zahărului este fermentat, mai înainte de inhibiţia fermentaţiei prin concentraţia de alcool format.

Temperatura de fermentaţie are mare importanţă; ea nu trebuie să depăşească 23°-24 °C deoarece temperaturi mai ridicate sunt dăunătoare formării aromei vinului. Întrucât, în timpul fermentaţiei se degajă o cantitate considerabilă de căldură, vasele de fermentaţie trebuie răcite pentru a împiedica ridicarea temperaturii peste 23°C.

4. Limpezirea şi maturarea

La sfârşitul fermentaţiei, vinul nou este trecut în butoaie mari sau tancuri, unde rămâne cel puţin trei luni. Din când în când, vinul este tras, fără a tulbura sedimentul format. În acest timp, are loc limpezirea şi maturarea vinului. Limpezirea vinului este un proces care începe

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

chiar la sfârşitul fermentaţiei şi constă în floculareа drojdiilor, care se depun la fundul vasului. Odată cu acestea, se depun şi taninurile, substanţele proteice, acidul tartric. Uneori limpezirea nu se realizează pe cale naturală şi este nevoie de adaosul unor substanţe în acest scop, ca de exemplu: albuş de ou, gelatină, bentonită. Clarificarea este terminată prin filtrare sub presiune.

În timpul maturării, vinul îşi pierde gustul de drojdie, asprimea, scade în aciditate şi capătă buchetul caracteristic. Scăderea acidităţii se datoreşte fermentaţiei malo-lactice produsă de bacteriile lactice care trensformă acidul malic în acid lactic, îmbunătăţind în felul acesta, calităţile de gust şi toleranţă pentru organism ale vinului. Formarea buchetului este influenţată de procesele de oxidare a substanţelor din vin, care au loc în timpul maturării şi se realizează cu ajutorul oxigenului pătruns prin porii butoiului. Maturarea la butoi durează de la câteva luni până la 2-5 ani. După aceea, urmează îmbutelierea în sticle, unde procesele de maturare continuă, ameliorând buchetul vinului.

În general, la vinuri deosebim două calităţi: **aroma**, care reprezintă calităţile strugurilor şi **buchetul** care este dat de produşii formaţi în cursul fermentaţiei şi al maturării.

Principalele tipuri de vinuri:

Se cunosc două categorii de vinuri:

- **vinuri seci**, cu un conţinut de alcool până la 13 % (în volume), la care, fermentaţia merge până la epuizarea completă a zahărului din must;
- **vinuri de desert (licoroase)**, cu un conţinut de alcool care poate ajunge până la 20 %, la care, fermentaţia nu merge până la epuizarea completă a zahărului din must. Ca vinuri de desert se cunosc: Sherry (14-17 % alcool etilic); Porto (15-17 % alcool etilic); Sauterne (10-12 % alcool etilic); Samos (11-15 % alcool etilic); Tokay (9-13 % alcool etilic).

Vermutul este un vin fortifiat, la care s-a adăugat alcool etilic până la gradul dorit, sirop caramel, care poate să ducă la o concentraţie de zahăr de 4 % până la 12-19 % şi o infuzie de plante, cel mai adesea din planta *Artemisia absinthium*. Conţinutul în alcool variază între 12-15 g %.

Şampania este un vin fermentat a doua oară în sticle speciale groase şi rezistente la presiunea de CO_2, care se realizează de 4-5,5 atm. În acet scop, vinul se amestecă cu o soluţie de zahăr şi se adaugă drojdie pentru a doua fermentaţie. Fermentaţia începe la 15°-18 °C şi se continuă la 8°-10 °C mai multe luni. Pentru a îndepărta drojdia, sticlele sunt agitate timp de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

două săptămâni la 4 °C şi apoi întoarse treptat, fiind aşezate cu gura în jos pe nişte rasteluri. Drojdia este colectată în acest fel spre gâtul sticlei; prin deschiderea acesteia, presiunea aruncă în afară sedimentul de drojdie. Spaţiul gol creat este reumplut cu soluţie de zahăr în vin şi sticlele se închid la loc, păstrându-se mai multe luni sau se vând direct.

Vinuri din alte surse decât struguri

Cidrul (din mere); **Saké** din orez (Japonia). În acest caz, sursa de zahăr este amidonul de orez, care este în prealabil zaharificat cu amilaze fungice. Plămada obţinută este acidulată cu acid lactic şi fermentată cu *Saccharomyces saké*, o variantă de *S. cerevisiae*, dar mult mai acidotolerantă. Saké are 16,5 % alcool şi este consumat adesea cald; **pulque**, vin din agave, consumat în Mexic şi unele ţări din America latină.

1.9.3. Industria spirtului şi a băuturilor alcoolice distilate

1. Fabricarea spirtului

Fabricarea alcoolului etilic (spirtului) prin fermentaţie este tot mai mult inlocuită de obţinerea lui pe cale sintetică din etilenă sau gaz natural, proces mult mai ieftin. Totuşi, o anumită cantitate de alcool etilic obţinut prin fermentaţie este cerut de industria farmaceutică şi de industria băuturilor alcoolice, unde alcoolul etilic sintetic nu poate fi folosit.

Materiile prime folosite sunt de trei categorii: amidonoase (cartof, porumb, orz, secară); zaharoase (melasă de sfeclă sau de trestie); celulozice şi leşii sulfitice de la industria lemnului.

Etapele fabricării sunt:

Zaharificarea: cu excepţia materiilor prime zaharoase, materiile prime amidonoase şi celulozice trebuie hidrolizate în prealabil la zaharuri simple fermentescibile, deoarece drojdiile nu conţin amilaze sau celulaze. Zaharificarea se face cu acizi: HCl, H_2SO_4 sau cu preparate enzimatice amilolitice de origine vegetală, ca malţul de orz, sau de origine microbiană, pentru materiile prime amidonoase.

Fermentarea se face prin însămânţarea plămezii zaharificate cu tulpini selecţionate de *Saccharomyces cerevisiae*. În cazul leşiilor sulfitice, care conţin o cantitate mare de pentoze, se foloseşte şi *Candida utilis*.

Distilarea: după terminarea fermentaţiei, plămada fermentată este supusă distilării obţinându-se spirtul brut care conţine 75-85 % alcool etilic şi ulei de fuzel.

Purificarea şi rectificarea se fac prin distilare fracţionată obţinându-se alcool etilic de aproximativ 97 % şi ulei de fuzel.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. Fabricarea băuturilor alcoolice distilate

Întrucât acţiunea drojdiei este limitată de cantitatea de alcool prezentă şi la 18 % alcool acţiunea ei încetează, nu se pot obţine prin simplă fermentaţie băuturi alcoolice cu conţinut de alcool mai mare de 18 %. Pentru obţinerea băuturilor alcoolice tari este nevoie de distilare.

Băuturile alcoolice distilate se împart în trei categorii:

a) băuturi obţinute pe bază de amidon ca substrat;

b) băuturi obţinute pornind de la un substrat zaharos;

c) băuturi obţinute prin adăugarea de substanţe aromatice la alcoolul pur, obţinut prin distilare şi rectificare.

a) Băuturile alcoolice obţinute pe bază de amidon sunt: **whisky** (sau **whiskey**), **scotch**, **bourbon** şi **arrak**.

Aceste băuturi presupun în prealabil zaharificarea amidonului cu malţ. Plămada zaharificată este acidifiată cu acid lactic, sau sulfuric la pH = 4,7 - 5,0 şi însămânţată cu drojdie. Toate drojdiile utilizate în distilerii sunt drojdii de fermentaţie superioară, rezistente la alcool şi care fermentează rapid. Fermentaţia durează aproximativ 3 zile la o temperatură mai mică de 32 °C. La sfârşitul fermentaţiei, alcoolul şi substanţele aromatice sunt distilate. Diferitele tipuri de whisky sunt distilate la diferite concentraţii finale de alcool şi apoi diluate la concentraţia dorită. Tipul aparaturii de distilare şi gradul final de alcool la care whisky este diluat, determină foarte mult substanţele aromatice şi caracterul produsului final. Majoritatea whisky-urilor americane sunt păstrate în vase de lemn. Multe dintre substanţele aromatice caracteristice ca guaiacolul sunt eliminate din lemn.

b) Băuturile alcoolice obţinute pe bază de substrate zaharoase sunt: **coniacul** şi **brandy** (din struguri); **ţuica** şi **şliboviţa** (din prune); **tequila** (din agave); **romul** (din zahăr de trestie); **calvados** (din mere).

c) Băuturile alcoolice obţinute prin adaos de substanţe aromatice, fie la alcoolul pur distilat, fie la brandy sau rom sunt: **ginul** (boabe de ienuper); **vodca** (fără nici un adaos) şi diversele lichioruri: **cremă de mentă** (adaos de mentă şi zahăr); **cremă de cacao** (adaos de cacao, vanilie şi zahăr); **chartreuse** şi **bénédictine** (adaos de ierburi aromate şi zahăr).

1.9.4. Panificaţia

Pâinea este un produs alimentar care se obţine prin coacerea în cuptor a unui aluat

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

preparat din făină de grâu, apă şi drojdie. Materile prime folosite sunt: făina, apa, clorura de sodiu (sarea) şi drojdia.

Făina întrebuinţată curent este cea de grâu. Cea de secară şi de porumb nu se pot folosi deoarece nu formează aluaturi. Calitatea făinii de grâu se datoreste glutenului, care ia naştere la prepararea aluatului, prin hidratarea diferită a celor două proteine existente în făină: **gliadina**, care se hidratează mai mult şi **glutenina**, care se hidratează mai puţin. Făina de grâu conţine 3/4 gliadină şi 1/4 glutenină. Făinurile de porumb, secară, conţin mai puţină gliadină şi de aceea nu se pot folosi la prepararea aluatului. Glutenul este o masă elastică alb-gălbuie, slab cenuşie; cu cât glutenul este mai elastic, cu atât CO_2 este reţinut mai bine şi pâinea este mai poroasă, mai crescută.

Drojdia folosită este *Saccharomyces cerevisiae*. Drojdia folosită în panificaţie este o drojdie de fermentaţie superioară, selecţionată astfel încât să producă fermentaţia şi la 55 °C, în cuptor, în faza iniţială de coacere. Înaintea fermentaţiei alcolice produsă de drojdie, în aluat începe întotdeauna o fermentaţie lactică, care crează un pH favorabil dezvoltării drojdiilor şi împiedică dezvoltarea microorganismelor dăunătoare care ar putea altera pâinea. Etapele fabricării pâinii sunt; pregătirea aluatului, dospirea şi coacerea.

1. Pregătirea aluatului

Se amestecă aproximativ jumătate din cantitatea de drojdie necesară cu o parte din făină şi o parte din apa în care s-a dizolvat sarea necesară. Se face o maia subţire, care se lasă în repaos, în vederea multiplicării drojdiei şi bacteriilor lactice. După aceea, se adugă restul de făină şi de apă cu sare şi se frământă. Frământarea asigură buna hidratare a proteinelor din făină, pentru formarea glutenului, omogenizarea completă a tuturor componentelor şi încorporarea în aluat a unei cantităţi de aer, necesară dezvoltării drojdiei.

2. Dospirea

Se face la temperatura de 32° -34 °C. Dospirea este un proces de fermentaţie alcoolică a zahărului existent în făină, sub acţiunea drojdiei. În urma fermentaţiei alcoolice rezultă CO_2 şi aluatul creşte. Cantitatea de zahăr existentă în făină este extrem de mică şi este formată în special din zaharoză. Zaharoza este fermentată rapid în prima perioada de pregătire a aluatului, astfel că, ea nu poate menţine fermentaţia alcoolică în perioadă următoare şi în special, în faza iniţială de coacere în cuptor. Fermentaţia este întreţinută de maltoza care se formează în permanenţă prin hidroliza amidonului, sub acţiunea β-amilazei existente în făină. În cazul făinurilor sărace în β-amilază, ameliorarea lor se face prin adăugarea de preparate

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

enzimatice amilolitice fungice: glucamilază produsă de *Aspergillus niger* sau *Rhizopus delemar*. În timpul dospirii, paralel cu fermentaţia alcoolică, continuă şi fermentaţia lactică începută înainte.

3. Coacerea

Se face în cuptoare speciale la 220°-270 °C şi durează 45-50 minute. Dospirea continuă şi în cuptor până când temperatura în interiorul aluatului ajunge la 55 °C. Fermentaţia alcoolică se face acum numai pe seama maltozei rezultată din hidroliza amidonului sub acţiunea β-amilazei care, la această temperatură acţionează optim. Drojdia folosită, fiind o drojdie de fermentaţie superioară, poate produce fermentaţia alcoolică până la 55 °C, apoi moare. Pentru ca pâinea să poată creşte în cuptor, în faza iniţială a coacerii trebuie împiedicată formarea cojii. Aceasta se realizează prin introducerea în cuptor a vaporilor de apă, care întreţin o atmosferă umedă. La sfârşitul coacerii, temperatura în miezul de pâine este de 96 °C. În timpul coacerii se produc următoarele modificări:

- proteinele coagulează reţinând CO_2 în masa de aluat ceea ce dă porozitate pâinii;
- amidonul din miezul pâinii se transformă în clei, reţinând cantitatea de apă din aluat. Cel din coajă, sub acţiunea căldurii se transformă în dextrine care se caramelizează, dând aspectul brun;
- alcoolul etilic format în timpul dospirii se evaporă.

2. Fermentaţia lactică

Fermentaţia lactică este procesul biologic prin care, zahărul din mediu este transformat în acid lactic de către microorganisme. Acidul lactic este produs în cantitate mică de multe microorganisme. Totuşi, un grup dintre acestea, bacteriile lactice, produc acid lactic în cantitate mare, ca produs al degradării zaharurilor.

2.1. Bacteriile lactice

Sunt foarte răspândite în natură pe plante (rădăcinoase), pe cereale, în lapte şi produse lactate, în diferite băuturi care conţin zahăr. De asemenea, cavitatea bucală, faringele, tractusul intestinal şi căile genitale ale omului şi animalelor, constituie habitatul natural al majorităţii speciilor de streptococi lactici.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

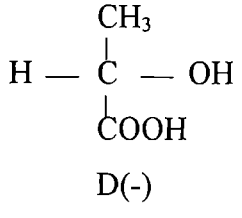
Din punct de vedere morfologic sunt fie bacterii cilindrice sau bacili (g. *Lactobacillus*), fie bacterii sferice sau coci, grupaţi în lanţuri scurte (g. *Lactococcus* şi g. *Streptococcus*), în diplococi, tetrade, sau lanţuri scurte (g. *Leuconostoc*), în diplococi, tetrade sau grămezi (g. *Pediococcus*). Sunt bacterii Gram-pozitive, nesporulate, imobile, anaerobe sau microaerofile, care cresc în mediu acid. După optimul temperaturii de dezvoltare deosebim:

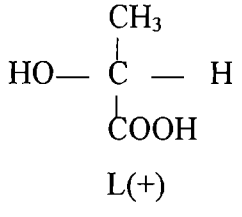
- bacterii lactice mezofile, care au temperatura optimă de dezvoltare 30°-35 °C;
- bacterii lactice termofile, care au temperatura optimă de dezvoltare 40°-45 °C;

În funcţie de produşii formaţi la fermentaţie, bacteriile lactice se împart în trei grupe:

- bacterii lactice obligat homofermentative (homolactice), care produc numai acid lactic ca produs principal. Acestea sunt specii de *Lactobacillus* ca: *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L. delbrueckii subsp. lactis, L. helveticus, L. acidophilus*, specii de *Lactococcus* ca: *L. lactis, L. cremoris*; specii de *Streptococcus* ca: *S. thermophilus*; specii de *Pediococcus* ca: *P. damnosus*, care infectează uneori berea.
- bacterii lactice obligat heterofermentative (heterolactice), care produc pe lângă acid lactic şi o serie de alţi produşi principali şi anume: CO_2, etanol, acid acetic, glicerină, manită. Dacă acidul lactic şi CO_2 apar în toate fermentaţiile heterolactice, ceilalţi produşi variază de la o specie de bacterie lactică la alta. Acest grup include specii de *Lactobacillus* ca: *L. brevis, L. lycopersici* şi specii de *Leuconostoc* ca: *Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc citrovorus, Leuconostoc dextranicum*.
- bacterii lactice facultativ heterofermentative, care produc fie numai acid lactic, fie acid lactic, CO_2 şi alţi produşi, în funcţie de zahărul pe car îl degradează (hexoză sau pentoză). În această categorie intră specii de *Lactobacillus* ca: *L. casei, L. plantarum* şi specii de *Pediococcus* ca: *Pediococcus acidilactici*.

În afara bacteriilor lactice, unele mucegaiuri, ca de exemplu, specii ale genului *Rhizopus* produc de asemenea, cantităţi apreciabile de acid lactic, dar în industrie se folosesc numai bacteriile lactice.





Bacteriile lactice necesită obligatoriu în mediu, factori de creştere pentru buna lor dezvoltare şi anume: acid

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

p-aminobenzoic, acid folic, acid nicotinic, riboflavină (vitamina B_2), acid pantotenic, tiamină (vitamina B_1), biotină.

Acidul lactic conţine un atom de carbon asimetric, deci poate exista sub două forme optic active, sensul rotaţiei optice nefiind acelaşi cu cel al configuraţiei sterice.

Izomerul format în fermentaţie depinde de natura dehidrogenazei lactice existentă în microorganismul utilizat: bacteriile lactice homofermentative şi mucegaiul *Rhizopus oryzae* conţin o L-lactat-dehidrogenază şi deci produc acid L(+)lactic.

Bacteriile lactice heterofermentative conţin o D-lactat-dehidrogenază şi deci produc acid D(-) lactic. Totuşi, numai în cazul fermentaţiei lactice produsă de *Rhizopus oryzae* apare în final izomerul L(+). În cazul fermentaţiei lactice produsă de bacteriile lactice, în final se obţine acidul lactic racemic (DL). Racemizarea formei D(-) sau L(+) formată iniţial, se datoreşte activităţii enzimei racemaza existentă la majoritatea bacteriilor lactice. Activitatea racemazei depinde de concentraţia de acid nicotinic din mediu care este un factor de creştere esenţial pentru bacteriile lactice .

2.2. Biochimia fermentaţiei lactice

Însuşirea celor două grupe de bacterii homo- şi heterofermentative, de a elabora ca produse principale de fermentaţie numai acid lactic sau acid lactic şi alte produse se explică prin căile diferite de degradare a glucidelor, care acţionează la aceste bacterii.

1. Fermentaţia homolactică

În fermentaţia homolactică, produsul principal obţinut este numai acidul lactic, iar produsele secundare nu apar decât în urme. La bacteriile homolactice, fermentaţia lactică a glucidelor decurge după ciclul glicolizei (calea E.M.P.) până la acid piruvic. Acidul piruvic este redus apoi la acid lactic cu $NADH+H^+$ format în cursul glicolizei, sub acţiunea lactat dehidrogenazei existentă la aceste bacterii (Fig. 15). Bilanţul energetic al fermentaţiei este aşa cum se vede din Fig. 15, de două molecule de ATP.

2. Fermentaţia heterolactică

În fermentaţia heterolactică se obţin ca produşi principali: acid lactic, CO_2, etanol, acid acetic, glicerină, manită, iar ca produşi secundari: acetoină, diacetil şi 2-3-butandiol.

Formarea produşilor principali are loc prin degradarea glucidelor pe calea pentozofosfaţilor, suplimentată cu enzima fosfocetolază, specifică acestor bacterii. Luându-se în considerare enzimele cheie ale ciclului glicolizei, adică aldolaza, şi ale ciclului

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

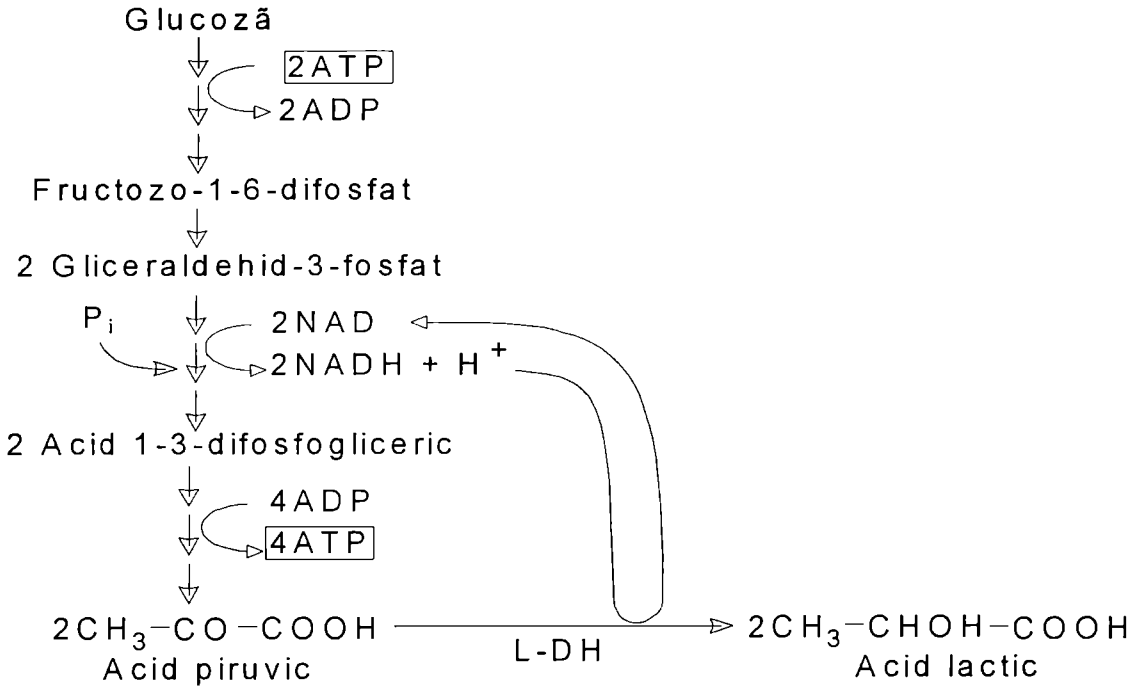


Fig. 15. Schema fermentatiei homeolactice

Legenda: P_i = fosfat
L-DH = Lactat-dehidrogenază
Bilanț energetic: 4ATP - 2ATP = 2ATP

pentozofosfaţilor, adică dihidrogenazele C_6 (glucozo-6-fosfatdehidrogenaza şi 6-fosfogluconat-dehidrogenaza), s-a ajuns la concluzia că deosebirea esenţială între bacteriile homolactice şi cele heterolactice este de ordin enzimatic şi că, din acest punct de vedere, bacteriile lactice se pot clasifica în trei grupe:

- bacterii lactice obligat homofermentative, care conţin aldolază, dar sunt lipsite de dehidrogenazele C_6;
- bacterii lactice obligat heterofermentative, care conţin dehidrogenazele C_6, dar sunt lipsite de aldolază;
- bacterii lactice facultativ heterofermentative, care conţin atât aldolază cât şi dehidrogenazele C_6, dar care fermentează hexozele pe calea ciclului glicolizei, iar pentozele pe calea ciclului pentozofosfaţilor (de exemplu: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*).

Degradarea hexozelor de către bacteriile heterolactice este iniţiată de către dehidrogenazele C6, care iniţiază de fapt ciclul pentozofosfaţilor, transformând glucoza într-o pentoză: ribulozo-5-fosfat. Aceasta se izomerizează la xilulozo-5-fosfat, care sub acţiunea fosfocetolazei se scindează în gliceraldehid-3-fosfat şi acetil-fosfat (Fig. 16).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Gliceraldehid-3-fosfatul se transformă mai departe în acid lactic pe calea ciclului glicolizei, ca şi la bacteriile homolactice. Acetil fosfatul se poate transforma în etanol, sau acid acetic, după garnitura de enzime a speciei respective.

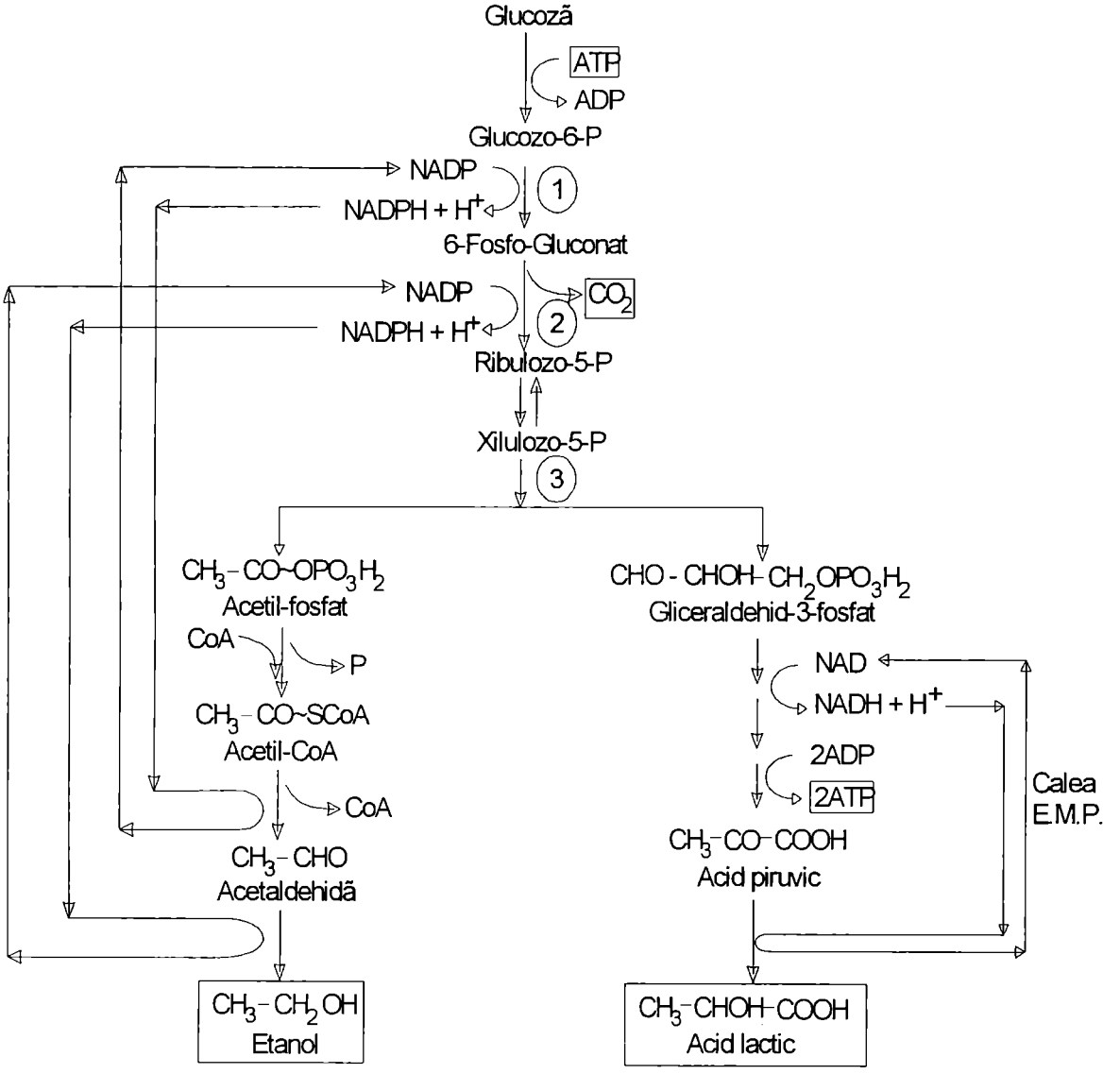


Fig. 16. Fermentația heterolactică produsă de *Leuconostoc sp.*

Legenda: (1) = Glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza

(2) = 6-Fosfogluconat-dehidrogenaza

(3) = Fosfocetolaza

Bilanț energetic: (2-1) ATP = 1ATP

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În general, la degradarea hexozelor de către bacteriile heterolactice există trei posibilităţi:

a) gliceraldehid-3-fosfatul rezultat din reacţia de scindare a xilulozo-5-fosfatului este metabolizat cantitativ la acid lactic, pe calea ciclului glicolizei. În acest caz, acetil-fosfatul rezultat din aceeaşi reacţie de scindare, funcţionează ca unic acceptor de hidrogen, de la $NADPH+H^+$ şi trece cantitativ în etanol. Reacţia globală de fermentaţie este:

GLUCOZĂ $\longrightarrow$ ACID LACTIC + ETANOL + CO_2

Bilanţul energetic este de 1 ATP. După această schemă are loc fermentaţia heterolactică produsă de *Leuconostoc sp.*

b) gliceraldehid-3-fosfatul este metabolizat numai parţial la acid lactic. O parte, funcţionează ca acceptor de hidrogen de la $NADPH+H^+$ rezultând glicerină. Acetil-fosfatul, în acest caz, funcţionează parţial ca acceptor de hidrogen de la $NADPH+H^+$ cu formare de etanol, iar parţial se transformă în acid acetic. Bilanţul fermentaţiei este:

GLUCOZĂ $\longrightarrow$ ACID LACTIC + GLICERINĂ+ ETANOL + ACID ACETIC + CO_2

Bilanţul energetic este de 1 ATP. După această schemă are loc fermentaţia heterolactică produsă de *Lactobacillus brevis.*

c) ca acceptor de hidrogen de la $NADPH+H^+$ funcţionează în exclusivitate fructoza din mediu, în cazul în care aceasta este fermentată heterolactic în locul glucozei, rezultând manită. În această situaţie, gliceraldehid-3-fosfatul este metabolizat cantitativ la acid lactic, iar acetil-fosfatul la acid acetic. Bilanţul fermentaţiei este:

FRUCTOZĂ $\longrightarrow$ ACID LACTIC + ACID ACETIC + MANITĂ + CO_2

Bilanţul energetic este de 2 ATP, deoarece, în acest caz, energia din legătura macroergică a acetilfosfatului nu se pierde, ca în cazul reducerii la etanol, ci serveşte la formarea unei molecule de ATP, conform reacţiei, catalizată de enzima acetatkinaza:

$$CH_3\text{-}CO\sim OPO_3H_2 + ADP \xrightarrow{\text{acetatkinaza}} CH_3\text{-}COOH + ATP$$

După această schemă are loc fermentaţia heterolactică produsă de *Lactobacillus lycopersici.*

În cazul în care glucidul fermentat heterolactic este o pentoză, se formează numai acid lactic şi acid acetic, bilanţul energetic fiind tot 2 ATP (Fig. 17). Dintre produşii secundari ai fermentaţiei heterolactice, interesează formarea acetil-metil-carbinolului (acetoinei), care

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

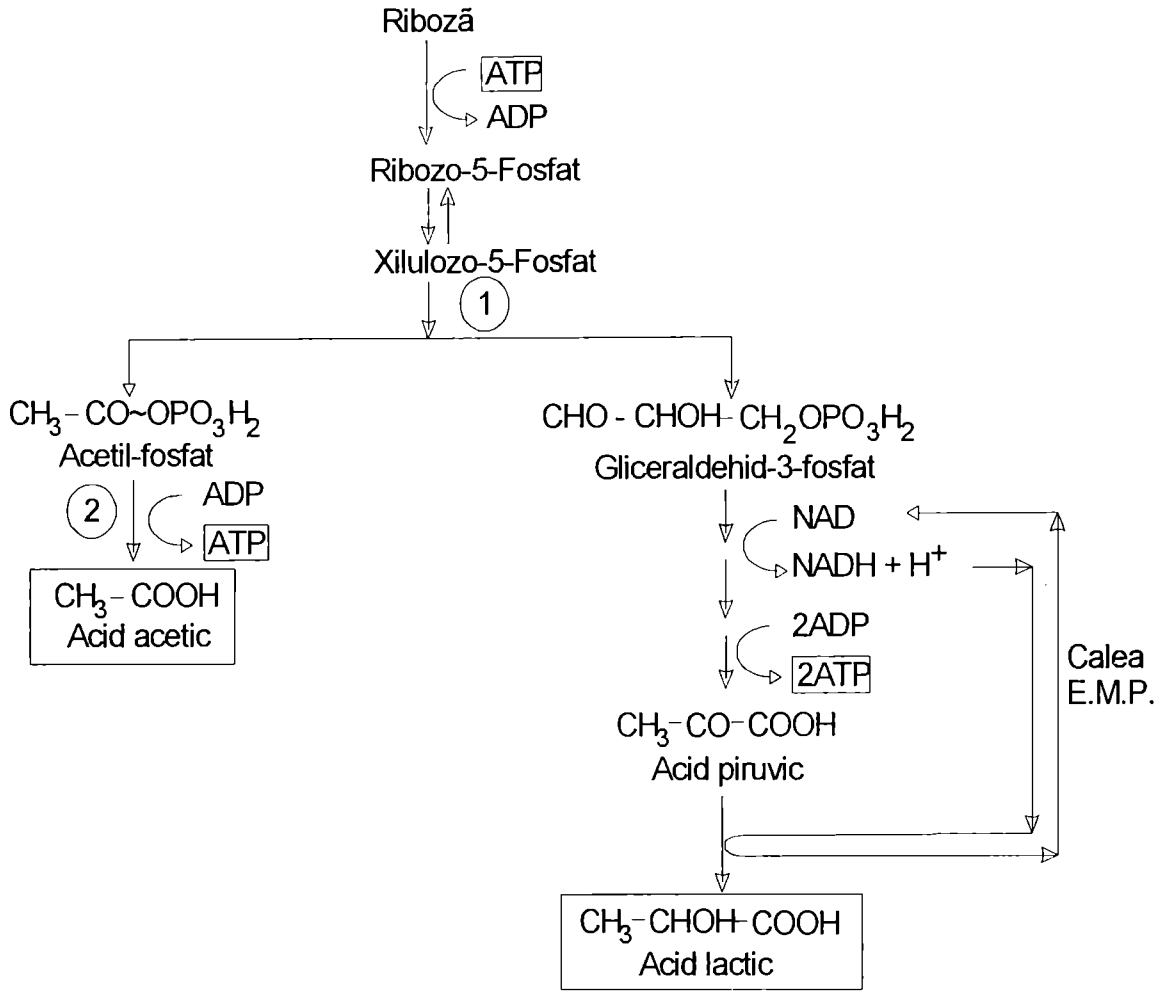


Fig. 17. Fermentația heterolactică a pentozelor

Legenda: (1) = Fosfocetolaza

(2) = Acetatkinaza

Bilanț energetic: (3-1)ATP = 2ATP

diferă la bacteriile lactice şi în general la toate bacteriile faţă de drojdii. Deoarece bacteriile nu conţin carboligază, formarea acetoinei în acest caz are loc prin condensarea a două molecule de acid piruvic, cu formare de CO_2 şi formarea intermediară de acid α-acetolactic, reacţie care necesită prezenţa TPP şi Mn^{2+}. Acidul α-acetolactic este decarboxilat apoi de o enzimă specifică la acetoină (Fig. 18).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.3. Factorii care influenţează fermentaţia lactică

1. Starterii de fermentaţie. La început, fermentaţia lactică era realizată cu microbiota spontană existentă pe suprafaţa sau în interiorul produsului supus fermentaţiei. În momentul de faţă se folosesc culturi pure de **bacterii lactice**, numite starteri de fermentaţie. În producţia industrială se preferă bacterii lactice homofermentative, deoarece produc până la 90-98 % acid lactic, raportat la zahărul fermentat. Alegerea microorganismului folosit ca starter de fermentaţie se face în funcţie de materia primă folosită ca substrat de fermentaţie şi de temperatura de fermentaţie.

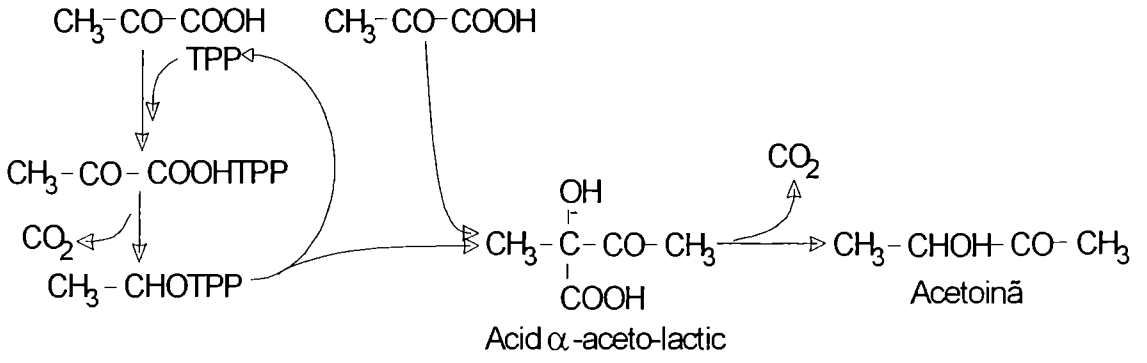


Fig. 18. Formarea acetoinei în fermentaţia heterolactică

Legenda: TPP = Tiaminpirofosfat

Astfel, pentru materiile prime care conţin glucoză, maltoză, zaharoză, se preferă *Lactobacillus delbrueckii* sp. *delbrueckii*, pentru cele care conţin lactoză, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*; pentru cele care conţin pentoze, *Lactobacillus plantarum*.

În ceea ce priveşte temperatura, pentru 45°-50 °C se preferă *Lactobacillus delbrueckii* sp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, iar pentru 30 °C se preferă *Lactococcus lactis*.

2. Indicele pH. Bacteriile lactice sunt sensibile la pH acid creat prin acumularea în mediu a acidului lactic. Fermentaţia lactică decurge optim la un pH cuprins între 5,5, şi 6,0. La pH = 5,0 fermentaţia lactică este puternic inhibată, iar sub pH = 4,5 încetează complet. De aceea, pentru menţinerea valorii optime de pH, care să asigure dezvoltarea bacteriilor, este necesară prezenţa în mediu a unui tampon, sau neutralizarea pe parcursul fermentaţiei a acidului lactic format.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3. Sensibilitatea la bacteriofag este o problemă foarte importantă, deoarece numeroase bacterii lactice sunt lizogene. Incidenţa lizogeniei printre streptococii lactici este de 85 % şi este destul de frecventă şi la lactobacili. Dat fiind pagubele foarte mari pe care le pot provoca în industrie contaminările cu fagi, selecţionarea prin mutageneză a tulpinilor de bacterii lactice rezistente la fag este o modalitate de evitare a contaminării.

Alte modalităţi sunt:

- folosirea în mediu a unor agenţi de complexare a Ca^{2+} (oxalaţi, citraţi, pirofosfaţi) ştiut fiind faptul că ionii de Ca^{2+}sunt necesari pentru replicarea bacteriofagului; cel mai eficace în acest sens se dovedeşte oxalatul de amoniu;
- realizarea unei bune asepsii a spaţiilor de fermentaţie şi a echipamentului industrial, prin folosirea de substanţe antiseptice ca: hipocloriţi, cloramine, săruri de amoniu cuaternar. Cele mai bune rezultate le dau preparatele clorinate.

2.4.Industrii bazate pe fermentaţia lactică

2.4.1. Fabricarea acidului lactic

Acidul lactic se fabrică numai prin fermentaţie, cu ajutorul bacteriilor homolactice: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus* sau facultativ heterolactice, *Lactobacillus plantarum*.

Ca materii prime se folosesc: materii prime amidonoase (cereale şi cartofi), materii prime zaharoase ca: glucoză tehnică şi purificată, melasă de sfeclă şi de trestie, zer şi leşii sulfitice. Materiile prime amidonoase se zaharifică cu malţ sau cu amilaze fungice, înainte de fermentare. Microorganismul se alege în funcţie de materia primă folosită. De obicei, pentru materiile prime amidonoase (glucoză, zaharoză, melasă) se foloseşte *Lactobacillus delbrueckii*; pentru zer, *Lactobacillus bulgaricus*; pentru leşii sulfitice *Lactobacillus plantarum*, care fermentează şi pentozele.

Temperatura de fermentare este de 45 °- 50 °C pentru *Lactobacillus delbrueckii* şi *Lactobacillus bulgaricus* şi de 30 °C pentru *Lactobacillus plantarum*. Pentru menţinerea indicelui pH la valoarea optimă de 5,5 - 6,0 se adaugă în mod automat lapte de var sau amoniac, sau $CaCO_3$ pe parcurs. Randamentul de conversie a zahărului în acid lactic este de 85-90 %. La sfârşitul fermentaţiei, plămada se alcalinizează cu lapte de var, se fierbe, se filtrează, se decolorează cu cărbune, se concentrează, se descompune lactatul de calciu cu acid sulfuric, sulfatul de calciu se filtrează, filtratul şi apele de spălare se concentrează la 50% acid

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

lactic şi astfel se obţine acidul lactic tehnic. Pentru obţinerea acidului lactic alimentar şi farmaceutic, de puritate avansată, metoda cea mai bună este transformarea acidului lactic în lactat de metil, distilarea esterului sub vacuum, descompunerea esterului cu recuperarea alcoolului metilic şi concentrarea în vacuum a soluţiei de acid lactic până la gradul dorit.

Prin folosirea celulelor de *Lactobacillus delbrueckii* imobilizate pe alginat de sodiu pentru obţinerea acidului lactic, randamentul realizat este de 97 % din glucoză, mai mult de 90 % din acidul lactic obţinut fiind izomerul L(+).

Acidul lactic are numeroase utilizări în industria farmaceutică, alimentară, textilă şi de pielărie. Sub formă de lactat cu diferiţi cationi: calciu, fier, este folosit la prepararea specialităţilor farmaceutice, iar sub formă de esteri, în special cu alcooli superiori, este folosit ca solvent sau ca plastifiant.

2.4.2. Industria produselor lactate

1. Lapte acru cremos (lapte acru, lapte bătut) se obţine prin ţinerea laptelui proaspăt la 20°-22 °C, timp de 15-20 h, sau mai mult. Înăcrirea şi coagularea se datoresc dizvoltării microbiotei naturale pătrunsă în lapte în timpul mulsului, formată din specii de *Lactococcus*: *L. lactis* şi *L. cremoris*.

2. Iaurtul se prepară din lapte fiert sau pasteurizat, care se răceşte la 50 °C şi se însămânţează cu un amestec în anumite proporţii de culturi selecţionate de *Lactobacillus bulgaricus* şi *Streptococcus thermophilus*. Laptele însămânţat se ţine 9-16 ore la temperatura de 40 °C, după care, se răceşte repede cu apă rece sau gheaţă şi se păstrează la rece până la consumare. Dacă procesul de fermentare nu se opreşte la timp prin răcire, iaurtul devine prea acru. Gustul caracteristic al iaurtului se datoreşte acidului lactic şi acetaldehidei formate, în special ca rezultat al activităţii a bacteriei *L. bulgaricus*.

3. Laptele acidofil se obţine din lapte parsteurizat, care se însămânţează cu *Lactobacillus acidophilus*, bacterie lactică izolată din intestinul omului. De obicei, *Lactobacillus acidophilus* se foloseşte în amestec cu streptococi termofili, care produc substanţe aromatizante, ce fac laptele acidofil mai plăcut. Laptele acidofil este foarte asemănător cu laptele acru, dar are o aciditate mai redusă. Smântâna şi untul. Smântâna se obţine din frişcă pasteurizată, la care se adaugă bacterii lactice. Untul se obţine prin fermentaţia lactică a smântânii dulci, obţinută din lapte, prin separarea cu ajutorul separatoarelor centrifugale. Microbiota lactică implicată în fermentaţia smântânii este formată din streptococi (90 %), în special *Lactococcus lactis* şi *Lactococcus cremoris* şi specii de *Leuconostoc* (10 %), ca: *Leuconostoc citrovorus*. Acesta din urmă dă aroma caracteristică a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

untului, prin diacetilul format din degradarea acidului citric adăugat smântânii în proporţie de 0,1 %.

4. Chefirul este o băutură acidă, slab alcoolică, care se prepară din lapte, prin fermentare cu o microbiotă specifică existentă în boabele de chefir şi formată din: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus caucasicus* plus specii de drojdii: *S. cervisiae*, *S. unisporus*, *C. kefyr*, *C. valida*, *Kluyveromyces lactis*. Boabele de chefir sunt formate din cazeină coagulată care reţine bacteriile şi drojdiile şi au o consistenţă gelatinoasă. Prin uscare, devin sfărâmicioase, dar microbiota din boabele uscate rămâne viabilă ani de zile şi prin înmuiere în lapte devine din nou activă. Pentru prepararea chefirului, laptele se adaugă peste boabele de chefir proaspete şi se ţine 24 de ore la temperatura de 20 °C, în care timp are loc fermentarea lactică şi alcoolică a lactozei. Laptele fermentat se separă de boabele de chefir prin strecurare; boabele de chefir se folosesc pentru o nouă fermentaţie, iar laptele fermentat, cu un conţinut de 1-1,5 % acid lactic şi 0,25 % alcool etilic, se poate consumă.

5. Brânzeturile fermentate

Bacteriile lactice joacă un rol important în procesul de obţinere şi maturare a brânzeturilor. La prepararea brânzeturilor se deosebesc trei faze: coagularea lapteluui, prepararea şi sărarea caşului, maturarea.

Coagularea: laptele destinat producerii brânzeturilor este mai întâi pasteurizat şi apoi supus unei fermentaţii lactice, prin însămânţare cu bacterii lactice selecţionate: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*. În timpul fermentaţiei lactice, valoarea pH a laptelui scade la 5,00, această valoare fiind optimă pentru coagulare. Coagularea laptelui se face cu cheag, preparat din stomacul de viţel sau de miel, care conţine o proteinază de coagulare, numită renină. În prezent, se tinde înlocuirea cheagului cu preparate enzimatice proteolitice tip renină de origine microbiană (bacteriană sau fungică). Coagularea constă în transformarea cazeinei solubile din lapte în paracazeină insolubilă, care cu ionii de calciu din mediu formează paracazeinatul de calciu. Această transformare presupune o proteoliză limitată a cazeinei, în urma căreia se eliberează grupări -OH din legăturile fosfoamidice ale cazeinei, care reacţionează cu ionii de calciu din mediu, determinând coagularea.

Prepararea şi sărarea caşului

După terminarea procesului de coagulare urmează prelucrarea coagulului la caş. Pentru aceasta, coagulul se mărunţeşte şi se pune la presă pentru a fi stors de zer. Caşul care se obţine se pune, pentru sărare, în saramură de 18-20 %. Prin sărare, caşul se întăreşte şi o serie

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de bacterii dăunătoare, producătoare de gaze şi arome neplăcute sunt oprite din dezvoltare. După sărare, caşul se scurge de saramură şi se depune în spaţiul de maturare.

Maturarea

Componentele din brânză care suferă transformări importante în timpul maturării sunt: lactoza, paracazeinatul de calciu şi lipidele.

Lactoza este fermentată de microbiota lactică la acid lactic, care transformă paracazeinatul de calciu în paracazeină şi lactat de calciu. Paracazeina este degradată treptat de enzimele proteolitice din bacteriile lactice, în peptone şi aminoacizi. Aceste bacterii lactice, după ce au efectuat fermentaţia lactică a lactozei mor şi, prin autoliză, eliberează enzimele proteolitice care degradează paracazeina.

Lactatul de calciu este fermentat de bacteriile propionice la acid propionic, acid acetic, CO_2 şi H_2O. Bacteriile propionice există şi în laptele crud, dar ele dezvoltându-se încet, nu devin importante decât în faza de maturare.

Lipidele sunt hidrolizate la gliceriñă şi la acizi graşi. Toate aceste substanţe influenţează favorabil gustul şi aroma brânzei.

La brânza şvaiţer, caşul în prealabil încălzit la 55°-58 °C şi apoi răcit, se însămânţează cu bacterii lactice: *Lactobacillus casei* şi *Lactobacillus helveticus* şi cu bacterii propionice selecţionate ca *Propionibacterium shermani*. Găurile din brânza şvaiţer se datoresc acumulării de CO_2 în cursul fermentaţiei propionice produsă de bacteriile propionice.

La brânza Roquefort, masa de caş se însămânţează cu sporii mucegaiului *Penicillium roqueforti*. Sporii germinează în masa de caş, la 20 °C, apoi caşul se sărează în saramură şi după o şedere de 1-2 zile în spaţiul de maturare, la 10-20 °C, pentru zvântare, se înţeapă bucăţile de brânză cu ace speciale, pentru a asigura accesul oxigenului în interiorul masei de brânză. În condiţii de aerobioză, mucegaiul fructifică şi sporii formaţi dau brânzei, pe tăietură, aspectul caracteristic, verde marmorat. Mucegaiul contribuie la formarea aromei caracteristice, prin descompunerea lipidelor în acizi grasi şi glicerină. Acizii graşi care contribuie la formarea aromei sunt: acizii butiric, caproic, caprilic. La aromă mai contribuie şi esterii acizilor graşi cu alcoolii rezultaţi în cursul procesului de maturare.

La brânza Camembert, caşul se însămânţează cu sporii mucegaiului *Penicillium camemberti*, bogat în enzime proteolitice şi lipolitice. Acest mucegai se dezvoltă la suprafaţa brânzei şi procesul de maturare are loc de la exterior către interior, pe măsură ce enzimele difuzează în masa brânzei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În cazul acestor două tipuri de brânzeturi s-a pus în evidenţă rolul deosebit al microbiotei de drojdii în procesul de maturare şi anume:

- dezacidifierea pastelor de brânză; consumând acidul lactic format de către bacteriile lactice participă la creşterea valorii pH de la 4,5-5,5 la 6,0-7,0;
- fermentaţia lactozei produsă de unele specii cum ar fi: *Kluyveromyces lactis*, K. *marxianus*, *Candida famata*, contribuie la apariţia găurilor în pastă, datorită producerii CO_2 din lactoză;
- formarea de compuşi aromatici ca; fenilacetaldehidă, alcooli, acizi graşi, esteri;
- stimularea creşterii şi activităţii microorganismelor constitutive ale microbiotei normale; de exemplu, drojdiile activează dezvoltarea lactobacililor sau producţia de metilcetonă de către *Penicillium roqueforti*;
- inhibiţia microbiotei bacteriene şi fungice dăunătoare (*Clostridium sp., Mucor sp.*)
- la sfârşitul procesului de maturare, microbiota de drojdie ajunge la valoarea de 10^7U.F.C. /g în brânza Camembert şi de 10^9 U.F.C./g în brânza Roquefort .

2.4.3. Conservarea produselor vegetale prin murare

Principiul pe care se bazează această metodă de conservare este acela că, prin fermentaţia lactică a zahărului din produsele vegetale respective, se obţine acid lactic, care funcţionează ca antiseptic, împiedicând dezvoltarea altor bacteii dăunătoare şi conservând astfel produsul respectiv. Astfel se conservă varza, castraveţii şi alte produse vegetale, prin procedeul numit murare. Aceste produse se pun în saramură, a cărei concentraţie în NaCl este variabilă în funcţie de produsul care se conservă. Sarea are un triplu efect: prin osmoză contribuie la formarea zemii necesare procesului de fermentaţie; împiedică dezvoltarea microorganismelor nedorite, care ar putea altera produsul; favorizează dezvoltarea bacteriilor lactice utile. Fermentaţia lactică are loc sub acţiunea microbiotei naturale, aflată pe suprafaţa produsului respectiv, formată din *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc* sp.

În acelaşi mod se conservă şi măslinele. Ele sunt în prealabil tratate cu o soluţie de NaOH sau KOH 1,7-2,0 % pentru îndepărtarea substanţelor amare şi îmbunătăţirea culorii, aromei şi texturii; apoi sunt spălate cu apă şi introduse în saramură de circa 11,5 % NaCl, unde se lasă să fermenteze lactic. Pentru accelerarea procesului se însămânţează cu culturi selecţionate de *Lactobacillus plantarum*.

2.4.4. Însilozarea furajelor

Este un procedeu de conservare a furajelor în stare verde, prin acidul lactic format în

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cursul fermentaţiei lactice a glucidelor din furaje.

Materia primă este tocată şi tasată în siloz, pentru eliminarea aerului şi pentru a favoriza eliberarea sucului bogat în substanţe nutritive, necesare dezvoltării bacteriilor lactice. Pentru împiedicarea dezvoltării bacteriilor butirice şi a proceselor de putrefacţie, se recomandă adăugarea de mici cantităţi de acizi minerali, în scopul coborârii valorii pH, iar mai recent, adăugarea de preparate enzimatice amilolitice, pectinolitice, celulozolitice şi proteolitice, care hidrolizează polizaharidele la zaharuri fermentescibile, iar substanţele proteice la produse de degradare uşor asimilabile, ceea ce are ca urmare intensificarea fermentaţiei lactice, cu acumularea de acid lactic. Pentru grăbirea şi dirijarea procesului de fermentaţie se recomandă însămânţarea masei verzi cu culturi selecţionate de *Lactobacillus plantarum*.

2.4.5. Obţinerea unor băuturi din cereale

În această categorie intră: borşul, cvasul şi braga. Primele două se obţin prin fermentaţie lactică; braga se obţine printr-o fermentaţie mixtă, lactică şi alcoolică. În cazul borşului participă *Lactobacillus delbrueckii*.

2.4.6. Fermentaţia malo-lactică din industria vinului

Este o fermentaţie lactică a acidului malic, din vinurile prea bogate în acest acid, fermentaţie care îmbunătăţeşte calităţile de gust ale vinului, deoarece îi reduce aciditatea, care-i dă un gust aspru şi în plus, acidul lactic este tolerat mai bine de tubul digestiv decât acidul malic. Prin această fermentaţie, acidul malic este transformat în acid lactic şi CO_2. Fermentaţia malo-lactică se efectuează dirijat, folosind culturi pure de bacterii lactice heterofermentative.

2.4.7 Utilizarea ca probiotice

Probioticele sunt definite ca preparate ce constau din microorganisme vii sau stimulatori ai creşterii microbiene (prebiotice) care afectează, în mod beneficial, microbiota indigenă a omului, animalelor, plantelor sau alimentelor. Microorganismele incluse ca probiotice sunt , în general, componente non-patogenice ale microbiotei normale, pintre cele mai frecvent folosite fiind bacteriile lactice.

3. Fermentaţia butirică şi fermentaţia acetono-butilică

Fermentaţiile butirică şi acetono-butilică sunt procese biologice înrudite din punct de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

vedere microbiologic şi biochimic, în urma cărora glucidele din mediu sunt transformate în acid butiric, acid acetic, CO_2 şi H_2 în cazul fermentatiei butirice şi în alcool butilic (butanol), alcool etilic (etanol), acetonă, CO_2 şi H_2 în cazul fermentaţiei acetono-butilice.

Microorganismele capabile să realizeze acest proces sunt bacteriile butirice, aparţinând genului *Clostridium*. Sunt răspândite peste tot în natură: sol, apă, vegetale, în special tuberculi de cartof, cereale şi făină de cereale, lapte, brânzeturi. Sunt bacterii strict anaerobe, mobile, obligat sporulate, de obicei subterminal şi nepatogene. Aparţin la două tipuri generale:

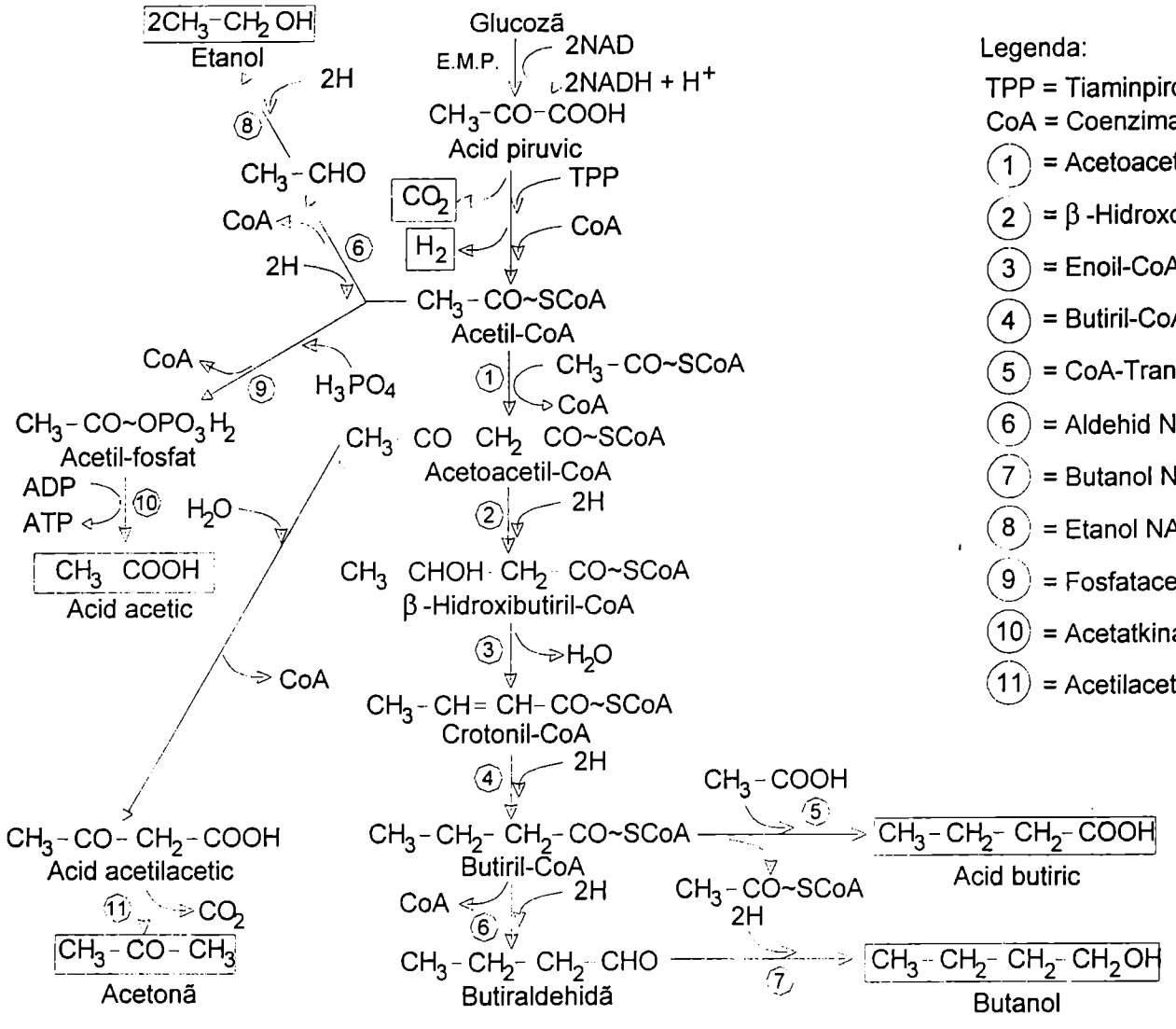
1) tipul butiric propriu-zis, în care se încadrează bacteriile care dau ca produşi finali acid butiric şi acid acetic. În această categorie intră: *Clostridium butyricum*, *C. saccharobutyricum*, *C. pasteurianum*;
2) tipul butilic, în care se încadrează bacteriile care dau ca produşi intermediari acid butiric şi acid acetic şi final, produşi neutri: butanol, etanol şi acetonă. În această categorie intră: *Clostridium acetobutylicum* .

3.1. Biochimia fermentaţiilor butirică şi acetono-butilică

Glucoza este degradată până la acid piruvic, în principal după schema EMP (Fig. 19). Acidul piruvic suferă apoi o scindare, printr-o reacţie caracteristică acestor bacterii, numită reacţia fosforoclastică a piruvatului, în urma căreia este decarboxilat şi dehidrogenat la acetil-CoA şi CO_2. Ca acceptor de hidrogen de la piruvat funcţionează ferredoxina, transportor de electroni cu potenţial redox foarte scăzut (-0,421 V) şi conţinând fier nehemic. De la ferredoxină hidrogenul este eliminat ca hidrogen molecular (H_2) cu ajutorul sistemului hidrogenazic. Reacţia fosforoclastică a piruvatului este o reacţie complexă, la care participă: sistemul piruvatdehidrogenazic, însoţit de TPP (tiaminpirofosfat), CoA, fosfatul, responsabil de formarea acetil-CoA şi a CO_2 şi sistemul hidrogenazic responsabil de formarea H_2. Ferredoxina functionează ca transportor de electroni între sistemul piruvatdehidrogenazic şi sistemul hidrogenazic, având rol în eliminarea H_2 . Participarea fosfatului explică formare de acetil-fosfat, alături de acetil-CoA în reacţia fosforoclastică, însă acetil-CoA este totdeauna în cantitate mai mare.

Formarea în continuare a produşilor de fermentaţie, împreună cu enzimele participante este redată în Fig. 19.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Legenda:

TPP = Tiaminpirofosfat

CoA = Coenzima A

(1) = Acetoacetil-CoA-tiolaza (β-cetotiolaza)

(2) = β -Hidroxobutiril-CoA-dehidrogenaza

(3) = Enoil-CoA-hidrataza (crotonaza)

(4) = Butiril-CoA-dehidrogenaza

(5) = CoA-Transferaza acizilor graşi

(6) = Aldehid NAD-oxidoreductaza

(7) = Butanol NAD-oxidoreductaza

(8) = Etanol NAD-oxidoreductaza

(9) = Fosfatacetiltransferaza

(10) = Acetatkinaza

(11) = Acetilacetat decarboxilaza

Fig. 19. Formarea diferiţilor produşi în fermentaţia butirică şi acetonobutilică

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dacă până la butiril-CoA bacteriile folosesc pentru reducerile necesare $NADH+H^+$, format în cursul glicolizei, se pune întrebarea de unde îşi procură $NADH+H^+$ necesar formării produşilor neutri, butanol şi etanol.

Este probabil că ferrodoxina poate cu hidrogenul format, în prezenţa flavinenzimelor, să reducă NAD la $NADH+H^+$, care este folosit apoi pentru reducerea butiril-CoA la butanol şi a acetil-CoA la etanol.

3.2. Fermentaţia acetono-butilică are importanţă practică datorită solvenţilor produşi; ea a fost utilizată în numeroase ţări până în 1950, când a fost total înlocuită de obţinerea produşilor respectivi pe cale petrochimică. În 1980 însă, căutarea de noi căi de producţie a carburanţilor pentru automobile, a dus la un nou interes pentru această fermentaţie, din cauza calităţilor remarcabile de carburant a amestecului produşilor obţinuţi. Un alt avantaj este acela că fermentaţia acetono-butilică utilizează şi pentozele, abundente în substratele lignocelulozice.

Pentru fermentaţie se folosesc culturi selecţionate de *Clostridium acetobutylicum*. Ca sursă de carbon se folosesc următoarele materii prime: melasă, amidon hidrolizat, glucoză, cereale (porumb), leşii sulfitice, hidrolizate din lemn. Ca sursă de azot se adaugă la diferite intervale de timp de la începutul fermentatiei, NH_4OH sau NH_3 gazos care serveşte şi pentru mentinerea valorii pH la 6,0-6,5. Se poate adăuga şi azot organic sub formă de *corn-steep*. Fermentaţia se conduce la temperatura de 30°-32 °C, în condiţii strict anaerobe. Se disting două faze în cinetica fermentaţiei:

- o primă fază, de acidogeneză, când are loc creşterea bacteriei, caracterizată printr-un metabolism producător de acizi: butiric şi acetic, ducând la scăderea valorii pH şi un amestec în cantităţi aproximativ echivalente (în volume) de CO_2 şi H_2. Începând de la o concentraţie de acizi de 2 g/l creşterea bacteriei este inhibată, până se opreşte complet, ceea ce se întâmplă după aproximativ 10 h. Biomasa produsă în această fază atinge un maxim (2-3 g/l în greutate uscată);
- a doua fază, de producere a solvenţilor, începe când concentraţia acizilor depăşeşte 3 g/l, valoarea pH scăzând la 4,0-4,5, care este un pH optim de acţiune al acetilacetat-decarboxilazei, enzima de formare a acetonei. Odată cu aceasta începe formarea de solvenţi, atât pe seama glucozei consumate cât şi pe seama acizilor formaţi, care sunt în mare parte reconsumaţi şi convertiţi în solvenţi, ceea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ce face ca valoarea pH să crească. În această fază, raportul H_2/CO_2 scade şi el la aproximativ 0,35. Biomasa bacteriană scade şi ea datorită morţii unor celule, sau sporulării altora. Moartea, sau sporularea bacteriilor este accelerată de prezenţa butanolului în mediu. La sfârşitul fermentaţiei, proporţia de solvenţi (butanol:acetonă:etanol) este de 6:3:1, adică: butanol: 60-75 %; acetonă: 25-35 %; etanol: 1-10 %. Randamentul de solvenţi în raport cu zahărul consumat se situează între 30-35 %.

Problemele actuale pe care le ridică această fermentaţie sunt:

- cultivarea discontinuă, care este mare consumatoare de energie; aceasta face ca procedeele de cultivare continuă să fie mai avantajoase;
- realizarea unor condiţii de sterilitate riguroasă, dat fiind sensibilitatea la contaminările bacteriene (în special cu bacterii lactice) şi mai des la bacteriofagi;
- limitarea producţiei de solvenţi la concentraţia de 2 %, datorită toxicităţii butanolului faţă de bacteria producătoare. De aici necesitatea cultivării continue şi selecţia mutantelor rezistente la butanol;
- clarificarea mecanismului declanşării fazei solvatogene, care nu este încă bine cunoscut .

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL IV
METABOLIŢI PRIMARI

1. Acidul citric

Până în 1923 acidul citric se obţinea din sucul fructelor citrice, prin presarea acestora şi precipitare ca sare de calciu. Erau necesare 40 – 50 tone de lamâi pentru a obţine o tonă de acid citric. Primul care a descris producerea acidului citric de către mucegaiuri a fost botanistul Wehmer în 1893. Studii amănunţite asupra producerii de acid citric de către mucegaiuri au fost făcute în S.U.A. de către Currie în 1917. Aceste studii au deschis calea pentru producţia industrială de acid citric folosind mucegaiurile din genul *Aspergillus* şi astfel apare în 1923, în S.U.A., la New York, prima fabrică de producere de acid citric pe cale microbiologică. În 1927 s-a construit o fabrică similară in Anglia, în 1928 în Cehoslovacia şi în 1938 în Germania. În ţara noastră, s-a contruit în 1973 o fabrică de producere a acidului citric pe cale microbiologică la Giurgiu.

1.1. Microorganisme producătoare

Microorganismele producătoare sunt reprezentate de mucegaiuri din genurile: *Aspergillus* (*A. niger, A. awamori, A. wentii, A. usamii, A. saitoi*), *Mucor* (*M. piriformis*); drojdii din genul *Candida* (*C. lipolytica, C. tropicalis, C. zeylanoides, C. subtropicalis, C. intermedia, C. oleophila, C. guilliermondi*). Cele mai bune rezultate se obţin însă cu *Aspergillus niger*, care este utilizat la ora actuală în exclusivitate în industrie, datorită facilităţii de cultivare, constanţei genetice, randamentelor ridicate şi absenţei de metaboliţi indezirabili.

1.2. Factorii care influenţează producerea de acid citric

1. Proprietăţile biochimice ale tulpinii de mucegai

Se folosesc tulpini selecţionate de *Aspergillus niger*, care să fie capabile să consume tot zahărul din mediu, producând cantităţi mari de acid citric, fără să fie jenate de aciditatea din

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mediu. Leopold şi Walter (1970) propun o tratare termică repetată, sub limita letală, a conidiilor de *Aspergillus niger* pentru mărirea randamentului de acid citric. În ultimul timp, se folosesc tulpini mutante de *Aspergillus niger*, obţinute cu radiaţii gama, cu azotiperită, sau cu nitrozoguanidină, cu rezultate foarte bune în mărirea randamentului de acid citric.

2. **Cantitatea şi calitatea inoculului** depinde de metoda de cultivare folosită. În cazul cultivării în suprafaţă, inoculul este reprezentat de spori, cantitatea optimă fiind de 1×10^8 spori/50 ml mediu. În cazul cultivării submerse, inoculul este vegetativ, fiind reprezentat de miceliu preformat, în vârstă de 22 de ore, sub formă de fragmente foarte mici, sferice, cu diametrul de 1-2 mm, numite *pellets*, în cantitate de 280×10^3 *pellets*/litru mediu.

Vârsta inoculului are de asemenea importanţă. S-a constatat că folosirea unui miceliu de 7 zile scade randamentul de acid citric, pe când al unuia de 3-4 zile determină înregistrarea de randamente mari.

3. **Compoziţia mediului de cultură.** Acidul citric, ca metabolit primar, nu este eliminat în mediu în cantităţi considerabile. De aceea, orice eliminare trebuie privită ca un rezultat al dereglării metabolismului normal al mucegaiului, ca urmare a lipsei din mediu, sau a prezenţei în cantitate insuficientă a unor factori esenţiali de dezvoltare. În general, s-a arătat că o producere abundentă de acid citric presupune o limitare a creşterii tulpinii producătoare, prin limitarea concentraţiei unuia sau mai multor elemente nutritive esenţiale. Interesează din acest punct de vedere: sursa de carbon, sursa de azot, fosfatul, urmele de metale şi lipidele.

1. Sursa de carbon: cele mai bune rezultate se obţin cu fructoză sau zaharoză, în concentraţie de 15 – 20%, cu un optim la 15%. Glucoza, în concentraţii echivalente, dă rezultate mult mai slabe. Numai polimerul fructozei, inulina, s-a dovedit la fel de eficient ca zaharoza. Concentraţia foarte mare de zahăr în mediu (15 – 20%) este necesară pentru a asigura acumularea de acid citric.

2. Sursa de azot este reprezentată de sulfat de amoniu sau de nitrat de amoniu şi niciodată de nitrat de Na sau K, deoarece prin consumarea NH_4^+ ca sursă de azot, mediul se acidifică, ceea ce este o condiţie pentru producerea acidului citric. În cazul azotaţilor de Na sau K, se consuma NO_3^- şi mediul se alcalinizează, ceea ce este în defavoarea producerii acidului citric. Din acelaşi motiv nici ureea nu poate fi folosită ca sursă de azot. Concentraţia de sursă de azot este cuprinsă între 0,3 si 1,5 g NH_4^+/l.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3. Fosfatul trebuie limitat la 0,03% pentru a asigura o producţie mai mare de acid citric. Cercetări mai amănunţite asupra acestui factor au stabilit că în condiţii de limitare riguroasă a ionilor metalici, fosfatul nu trebuie limitat. Totuşi, în condiţiile în care conţinutul în urme de ioni metalici nu poate fi efectiv controlat, este recomandat să se lucreze cu concentraţii scăzute de fosfat.

4. Urmele de metale: fierul, zincul şi manganul în concentraţii reduse sunt esenţiale pentru acumularea acidului citric. În caz contrar, se dezvoltă mai mult miceliul, iar cantitatea de acid citric este redusă.

Astfel, **zincul** trebuie să fie în concentraţie de cel mult 0,5 mg/l. Depăşirea acestei valori determină creşterea miceliului, dar citratul nu se acumulează. Aceasta se explică prin aceea că Zn^{2+} afectează sinteza acizilor nucleici şi a proteinelor şi în felul acesta influenţează creşterea.

Fierul trebuie să fie în concentraţie mai mică de 1 mg/l. Acţiunea fierului se explică prin aceea că este cofactor al aconitazei. Creşterea cantităţii de fier determină creşterea activităţii aconitazei şi scăderea randamentului de acid citric şi invers, scăderea cantităţii de fier determină scăderea activităţii aconitazei şi creşterea randamentului de acid citric.

Manganul trebuie să fie în concentraţie mai mică de 3 μg/l. Dintre toate metalele, manganul are cel mai pronunţat efect asupra randamentului de acid citric. La concentraţii de 20 μg/l randamentul în acid citric scade în mod drastic. Manganul are un rol complex atât în biosinteza, cât şi în acumularea acidului citric. Acest rol va fi discutat în subcapitolul privitor la biochimia producerii acidului citric.

Reducerea concentraţiei de ioni metalici din mediile de cultură folosite la fabricarea acidului citric, cum ar fi melasa, se face prin adăugare de $K_4Fe(CN)_6$ care-i fixează în complexe insolubile.

O constatare interesantă este că, dacă în mediile cu conţinut ridicat de ioni metalici (Fe^{3+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}) se adaugă alcooli inferiori ca: alcool metilic, alcool etilic, alcool izopropilic, în proporţie de 1–4% are loc o producţie crescută de acid citric, concomitent cu o scădere a creşterii miceliului. Natura exactă a efectului alcoolilor inferiori este necunoscută, dar, deoarece s-a constatat că urmele de metale, în special de mangan, sunt implicate în compoziţia membranei plasmatice, este de presupus că acţiunea alcoolilor inferiori se manifestă asupra membranei plasmatice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

5. Lipidele. Adăugarea lipidelor, sub formă de uleiuri naturale, bogate în acizi graşi nesaturaţi, măreşte randamentul în acid citric. Nu au acelaşi efect uleiurile bogate în acizi graşi saturaţi. Modul de acţiune al acestor lipide este controversat, deoarece ele nu inhibă creşterea miceliului, deşi măresc randamentul în acid citric. S-au emis mai multe ipoteze pentru a explica acţiunea acestor lipide:

- efect fizic prin modificarea tensiunii superficiale a mediului, ceea ce duce la mărirea eficienţei aerării;
- acceptori de hidrogen, alternativ cu oxigenul. Ipoteza se bazează pe faptul că analiza uleiului recuperat după terminarea procesului a evidenţiat un grad mare de hidrogenare a acizilor graşi nesaturaţi. Aceasta ar explica de ce, acizii graşi saturaţi nu îmbunătăţesc randamentul de producere a acidului citric. ;
- sursă de acetil-CoA necesară formării acidului citric. Lipidele ar furniza acetil-CoA prin mecanismul β-oxidării. Totuşi, aceasta nu explică de ce acizii graşi saturaţi, care şi ei sunt sursă de acetil-CoA, nu îmbunătăţesc randamentul de acid citric.

4. Valoarea pH. Menţinerea unor valori scăzute de pH este extrem de importantă pentru producerea acidului citric. În general, la valori de pH mai mici de 3,0, acidul citric este produsul major al procesului, în timp ce, la valori mai mari de pH se produc cantităţi substanţiale de acid oxalic şi acid gluconic. Optimum de pH este cuprins între 1,7 şi 2,0.

5. Aerarea este necesară, producerea acidului citric fiind un proces aerob. În condiţii submerse, aprovizionarea cu oxigen, chiar în condiţii de agitare şi aerare este mai mică decât în cazul cultivării în suprafaţă. Agitarea la o valoare de 400 r.p.m. realizează o îmbunătăţire a randamentului în acid citric la o valoare de 86%. Pe de altă parte, dacă introducerea de aer este stopată numai câteva minute, producerea de acid citric este întârziată în mod ireversbil şi nu revine complet la situaţia iniţială, chiar după reluarea introducerii aerului. Efectul încetării aerării asupra producerii de acid citric depinde de faza în care are loc întreruperea şi de durata întreruperii. De aceea, în timpul fazei de producere de acid citric, o întrerupere a aerării de numai două minute descreşte apreciabil producerea de acid citric. Este important de arătat că simultan, producerea de biomasă nu este inhibată, ba chiar este uşor stimulată.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

6. **Temperatura**. Se deosebeşte o valoare a temperaturii de incubare pentru creşterea miceliului: 32°C, şi altă valoare pentru faza ulterioară de producere a acidului citric: 25°C. Procentul de acid citric scade cu creşterea temperaturii, de la 89% la 25°C la 77% la 35°C.

6.1. Reglarea biosintezei şi acumulării acidului citric.

Metabolizarea glucidelor până la piruvat implică la *Aspergillus niger* participarea atât a căii EMP, cât şi a căii pentozofosfaţilor (HMP). S-a observat însă că în timpul creşterii nelimitate a mucegaiului, din punct de vedere procentual, participareea celor două căi este de 2:1 în favoarea căii EMP, în timp ce la producerea acidului citric este de 4:1 în favoarea căii EMP. De aceea, reglarea glicolizei este foarte importantă pentru producerea acidului citric (Fig. 20). Enzima reglatoare cheie a ciclului glicolizei este fosfofructokinaza, care în mod normal este inhibată de ATP şi de citrat şi activată de AMP. Fosfofructokinaza de la *Aspergillus niger*, nu este însă inhibată de citrat în timpul producerii acidului citric, ceea ce sugerează existenţa unui mecanism care face această enzimă insensibilă la citrat, mecanism dependent de condiţiile speciale de mediu, în special în ce priveşte compoziţia mediului de cultură.

S-a constatat că în acest mecanism este implicat manganul şi anume: deficienţa în Mn^{2+} a mediului determină reducerea activităţii căii HMP şi a enzimelor ciclului Krebs, ceea ce are ca rezultat o perturbare a anabolismului. Cel mai important lucru este însă faptul că deficienţa de Mn^{2+} determină o perturbare a metabolismului proteic cu o degradare crescută a acestora, ceea ce are drept rezultat creşterea concentraţiei intracelulare de NH_4^+. Concentraţia intracelulară crescută de NH_4^+ este un reglator foarte eficace al fosfofructokinazei deoarece produce reversia inhibiţiei fosfofructokinazei de către citrat şi reduce deci inhibiţia glicolizei (Fig. 20).

Acidul citric ia naştere din reacţia între acetil-CoA si oxalilacetat, reacţie catalizată de enzima citrat-sintaza existentă la *Aspergillus niger* (Fig. 20). Problema care se pune este: cum se explică faptul că citratul format în reacţia de condensare amintită se acumulează intracelular şi apoi în mediu, în loc să fie metabolizat mai departe prin ciclul Krebs. Condiţiile speciale de mediu joacă şi în acest caz un rol important şi anume:

- prezenta unei concentraţii mari de zahăr în mediu este necesară pentru a asigura o acumulare rapidă de citrat;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- citratul care se acumulează rapid inhibă enzima izocitrat-dihidrogenaza din ciclul Krebs;

- deficienţa de Fe^{2+} din mediu inhibă activitatea aconitat-hidratazei (aconitaza), al cărei cofactor este fierul;

- concentraţia intracelulară mare de NH_4^+, determinată de deficienţa de Mn^{2+}, inhibă α-cetoglutarat-dehidrogenaza.

Prin urmare, ciclul Krebs este inhibat la nivelul aconitazei, izocitrat-dehidrogenazei şi α–cetoglutarat-dehidrogenazei, ceea ce explică acumularea intracelulară a citratului. Pentru a-şi procura oxalilacetatul necesar funcţionării ciclului Krebs şi deci formării citratului, microorganismul apelează la o cale anaplerotică, care cel mai adesea este carboxilarea piruvatului, enzima piruvat-carboxilaza fiind constitutivă la *Aspergillus niger* (Fig. 20).

O ultimă problemă este eliminarea în mediu a citratului acumulat intracelular. Cercetările făcute în acest sens au arătat o alterare a permeabilităţii membranei plasmatice şi peretelui celular la *Aspergillus niger* producător de acid citric, alterare care este determinată tot de deficitul de Mn^{2+} din mediu.

Această alterare constă în scăderea trigliceridelor şi fosfolipidelor din membrana plasmatică şi creşterea cantităţii de chitină plus scăderea celei de β–glucan şi de polimeri ai galactozei din peretele celular. Ca urmare a acestei alterări de permeabilitate, acidul citric format este eliminat şi acumulat în mediu.

Unul din factorii extrem de importanţi în producerea acidului citric este, aşa cum s-a arătat, aerarea. De altfel, din ecuaţia:

$$\text{Glucoză} + 3/2\ O_2 \rightarrow \text{Acid citric} + 2\ H_2O$$

este clar că oxigenul este teoretic un substrat metabolic necesar pentru reoxidarea $NADH+H^+$ glicolitic. Pe de altă parte, fosfofructokinaza, enzima cheie a glicolizei este inhibată de ATP, care se formează în cursul respiraţiei cuplată cu ciclul Krebs, ceea ce ar presupune o limitare a glicolizei (Fig. 20). S-a constatat însă, că *Aspergillus niger* posedă o catenă respiratorie standard, prin care $NADH+H^+$ format în cursul glicolizei este reoxidat cu formare de ATP şi o ramificaţie alternativă, în care reoxidarea $NADH+H^+$ citoplasmatic are loc fără formare de ATP.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

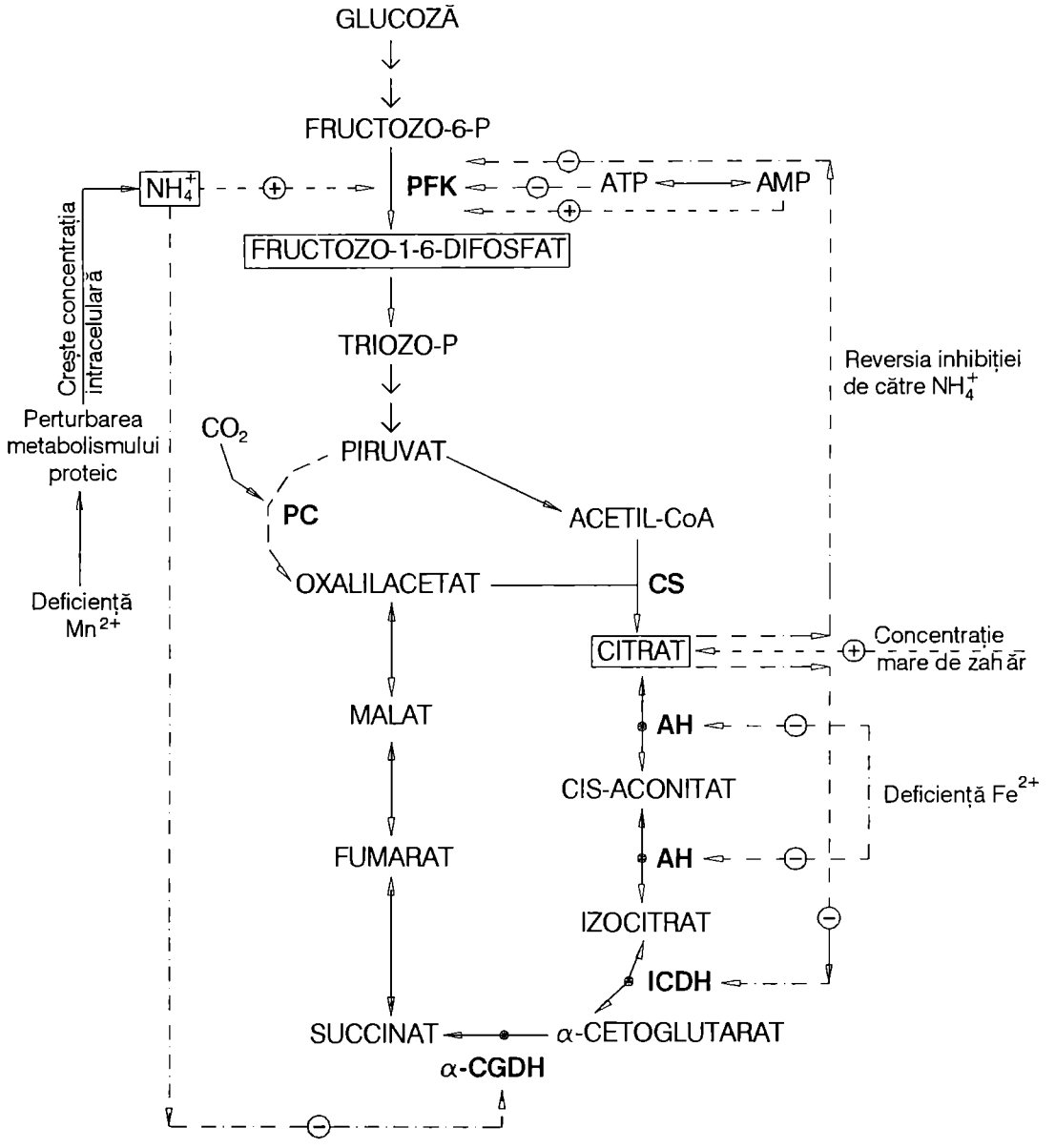


Fig. 20 Reglarea biosintezei și acumulării acidului citric

Legenda: **PFK** = Fosfofructokinaza
CS = Citrat-sintaza
AH = Aconitrat-hidrataza (aconitaza)
ICDH = Izocitrat-dehidrogenaza
α-CGDH = α-Cetoglutarat-dehidrogenaza
PC = Piruvat-carboxilaza
⊕ = Activare
⊖ = Inhibare

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Întrucât s-a observat că o scurtă întrerupere a aerării, care produce o scădere rapidă a producerii de acid citric, fără efect negativ asupra creşterii, inactivează ireversibil ramificaţia respiratorie alternativă, este clar că acest mecanism este un sistem prin care glicoliza este stimulată.

1.4 Cinetica producerii acidului citric

Producerea acidului citric are loc în două stadii: **stadiul de creştere al miceliului** şi **stadiul de producere a acidului citric**.

Stadiul de creştere a miceliului cuprinde trei faze:

1) **Faza germinarii conidiilor** în care începe multiplicarea intensivă a mucegaiului, cu formarea miceliului. Aceasta este corelată cu o consumare rapidă a azotului şi fosfatului din mediu şi o descreştere a valorii pH de la 2,4 – 2,6 la 1,7 – 1,8.

2) **Faza creşterii exponenţiale**, în care continuă creşterea miceliului într-un ritm rapid. În niciuna din aceste faze nu se acumulează acid citric.

3) **Faza incetinirii creşterii**, în care se observă o încetinire a creşterii, paralel cu începerea producerii de acid citric.

Stadiul de producere a acidului citric cuprinde două faze:

1) **Faza creşterii secundare**, în care creşterea miceliului continuă încă 24 – 30 ore, dar cu o viteză mai mică decât în faza de creştere exponenţială. Creşterea biomasei în acestă fază reprezintă 45 – 50% din randamentul final al miceliului. Totuşi, trăsătura caracteristică a acestei faze este declinul constant al vitezei specifice de creştere a mucegaiului, paralel cu accelerarea puternică a producerii acidului citric, viteza de formare a acestuia, atingând la sfârşitul acestei faze 1,1 g/h.

2) **Faza producerii acidului citric**, în care se produce aproape 80% din concentraţia finală de acid citric. Producerea de acid citric nu este proporţională cu cantitatea de miceliu şi cu sporularea lui, ci invers: miceliile subţiri şi slab sau deloc sporulate, produc cantităţi mai mari de acid citric, faţă de miceliile bine dezvoltate şi bine sporulate.

1.5 Producerea industrială şi utilizările acidului citric

La producerea industrială a acidului citric nu se foloseşte zaharoză pură, deoarece ar fi prea costisitor, ci se folosesc deşeuri ale altor industrii. Cel mai frecvent se foloseşte melasa de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sfeclă sau de trestie, reziduuri de la fabricarea zahărului care conţin zaharoză. Deoarece în melasă concentraţia de ioni metalici fiind prea mare ar inhiba producerea de acid citric, ea se tratează în prealabil cu ferocianură de potasiu, care îi precipită. Altă modalitate de tratament este folosirea alcoolilor cu greutate moleculară mică: metanol, etanol, izopropanol, în concentraţie de 4%, care face ca microorganismul să tolereze concentraţii ridicate de Zn, Fe, Mn, producând în acelaşi timp cantităţi crescute de acid citric.

Se cunosc două procedee industriale de obţinere a acidului citric:

- cultivarea în suprafaţă;
- cultivarea submersă.

Până nu de mult, majoritatea acidului citric se obţinea prin cultivare în suprafaţă, folosind un inocul sporulat al unei tulpini selecţionate de *Aspergillus niger*. Procesul durează 7 – 10 zile, cu un randament ce variază între 60% şi 90% acid citric.

În ultimul timp, s-a introdus cultivarea submersă, deoarece prezintă o serie de avantaje şi anume:

- obţinerea unor randamente mai mari;
- executarea unor operaţii mai simple;
- asigurarea unor condiţii de asepsie mai bune;
- durată mai redusă a procesului.

În acest caz se foloseşte un inocul vegetativ, reprezentat de *pellets*, în cantitate de 200 – 280 x 10^3 /l pellets. Procesul durează 6 zile, cu un randament de 100% acid citric.

Extracţia acidului citric format, cuprinde următoarele etape:

- separarea miceliului sterilizat în prealabil, prin filtrare;
- precipitarea acidului citric ca citrat de calciu, prin tratare cu oxid de calciu;
- separarea şi spălarea precipitatului;
- tratare cu H_2SO_4 şi separarea precipitatului de $CaSO_4$;
- decolorare cu cărbune şi concentrare sub vacuum;
- cristalizare.

Utilizări. Acidul citric are numeroase utilizări, fiind unul din acidulanţii cei mai larg utilizaţi în industria alimentară şi farmaceutică. Mari cantităţi de acid citric se folosesc la prepararea băuturilor carbogazoase şi în preparatele farmaceutice. În ultimii ani, cantităţi tot mai mari de acid citric, sub forma citraţilor şi a esterilor citraţilor sunt folosite ca plastifianţi şi ca

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

agenţi de chelatizare. Datorită numeroaselor sale utilzări, producţia mondială de acid citric depăşeşte 200.000 de tone anual şi este în continuă creştere.

2. Aminoacizii

2.1. Aspecte generale privind producerea microbiologică de aminoacizi

Dacă plantele verzi îşi pot sintetiza singure aminoacizii necesari, plecând de la compuşi anorganici simpli, organismele animale nu-şi pot obţine prin sinteză endogenă, decât o parte din aminoacizii necesari. Restul, trebuie să-i primească obligatoriu cu hrana, aceştia constituind aminoacizii esenţiali. În această categorie intră: lizina, treonina, valina, metionina, triptofanul, fenilalanina, leucina şi izoleucina. La aceştia, se adaugă histidina şi arginina, aminoacizi parţial esenţiali şi acidul glutamic, care deşi nu -este un aminoacid esenţial este foarte mult utilizat în industria farmaceutică şi alimentară, astfel încât, cererea în acest aminoacid este foarte mare.

Necesitatea în aminoacizi se pune în special, pentru mărirea valorii nutritive a alimentelor vegetale, care constituie baza alimentară a numeroase popoare, alimente care, sunt mai sărace în aminoacizi esenţiali. Astfel, din făina de porumb lipsesc lizina şi triptofanul, iar în gliadina grâului, lizina se află în cantitate insuficientă.

În general, aminoacizii sunt folosiţi în alimentaţia omului, în furajele animalelor, în medicină şi cosmetică, în industria chimică. Folosirea lor se bazează pe valoarea lor nutriţională, gust, activitate fiziologică şi caracteristici chimice. Din totalul aminoacizilor produşi industrial în lume, aproximativ 66% sunt folosiţi în alimentaţie, 31% în furajele animalelor şi 4% în medicină, cosmetică şi industria chimică.

Aminoacizii pot fi obţinuţi pe patru căi:

1) prin hidroliza proteinelor animale şi mai ales vegetale. L-glutamatul de exemplu, se obţinea până în 1950 din glutenul de grâu şi soia şi din melasă. Se obţin pe această cale produse optic-active. În prezent s-a renunţat la această metodă, deoarece, odată cu creşterea cerinţelor de diferiţi aminoacizi, ar necesita o cantitate imensă de materie primă alimentară;
2) prin sinteză chimică; metoda are dezavantajul, pe lângă faptul că este grea şi costisitoare, că se obţin preparate racemice, care trebuie separate apoi în cei doi antipozi optici;
3) prin biosinteză microbiologică;
4) pe cale enzimatică.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În aceste ultime două metode se obțin produse optic active. Ele sunt cele mai folosite actualmente, deşi, fiecare din ele prezintă atât avantaje, cât şi dezavantaje.

Metoda microbiologică are avantajul folosirii unor materii prime ieftine, dar producția respectivă necesită timp şi aminoacizii formați, trebuie separați de alți aminoacizi din mediu şi de diferite impurități, inclusiv de celulele microbiene.

Metoda enzimatică are avantajul că necesită mai puțin timp, este mai eficientă şi nu produce impurități şi deşeuri. Totuşi, această metodă are dezavantajul că nu se pot folosi materii prime ieftine. Substratul este adesea un precursor, sau o substanță înrudită chimic cu aminoacidul pe care vrem să-l obținem. Aceste substanțe sunt totdeauna mai scumpe decât materia primă folosită în metoda microbiologică. În plus, enzimele folosite nu sunt nici ele ieftine. De aceea, la ora actuală, tot metoda microbiologică este folosită pentru obținerea majorității aminoacizilor.

Capacitatea micoorganismelor de a elimina în mediul de cultură, mai ales la sfârşitul perioadei exponențiale de creştere, mici cantități de aminoacizi, a fost pusă în evidență în 1950 la bacterii, în 1952 la drojdii, în 1955 la mucegaiuri şi în 1958 la bacteriile miceliene din grupa actinomicetelor.

Începând din 1955, în Japonia, în laboratoarele lui Kinoshita şi ale colaboratorilor săi, a început un studiu sistematic asupra formării de aminoacizi de către microorganisme, în scopul găsirii unei posibilități de producere a acestora pe cale industrială. Au fost testate din acest punct de vedere, mai multe mii de microorganisme, incluzând tulpini tip cunoscute şi tulpini nou izolate.

Un studiu similar s-a făct începând din 1959, în Rusia, în laboratoarele lui Krasilnicov. Au fost testate sub raportul producerii de aminoacizi aproximativ 1000 de tulpini microbiene, dintre care 456 tulpini de bacterii, 264 tulpini de bacterii miceliene (actinomicete) şi 245 tulpini de drojdii. Aceste studii au arătat că majoritatea microorganismelor formează în mediul de cultură mici cantități de aminoacizi, dar, cei mai activi producători se află printre bacteriile din genurile *Arthrobacter, Mycobacterium, Micrococcus, Corynebacterium, Brevibacterium.*

În general, în mediul de cultură sunt prezenți totdeauna mai multe tipuri de aminoacizi şi mai rar se acumulează unul singur, în cantități substanțiale. Aminoacizii cei mai frecvent întâlniți în mediul de cultură al microorganismelor sunt: alanina, acizii glutamic şi aspartic, glicina, serina, valina şi leucina în cantitate de 1-2 mg/ml.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Problema care s-a pus deci, a fost aceea de a găsi modalitatea, ca microorganismele să acumuleze în mediu un singur aminoacid în cantitate mare, sau, într-un amestec, un aminoacid să predomine.

Deoarece celula microbiană produce în mod normal cantități limitate de aminoacizi, atât cât are nevoie pentru biosintezele celulare, iar biosinteza aminoacizilor în celula microbiană este supusă în orice moment mecanismelor de reglare metabolică la nivel molecular (în special inhibiția *feed-back* a activității enzimelor și represia sintezei enzimelor), pentru a realiza o producție mărită a unui anumit aminoacid, trebuie învinse aceste mecanisme de reglare metabolică la nivel molecular, deci trebuie acționat la acest nivel.

Producția microbiană de aminoacizi presupune realizarea următoarelor condiții:

1. stimularea pătrunderii în celulă a substratului nutritiv, care serveşte ca material de plecare în biosinteză;
2. împiedicarea reacțiilor secundare;
3. stimularea sintezei şi activității enzimelor implicate în biosinteza aminoacidului respectiv;
4. inhibarea sau reducerea activității enzimelor care produc degradarea aminoacidului respectiv;
5. stimularea excreției aminoacidului respectiv în mediul exterior.

Realizarea acestor deziderate s-a făcut pe două căi, corelate între ele:

1) Folosirea tehnicilor de mutageneză. O particularitate a industriei microbiologice de aminoacizi este folosirea la producerea de aminoacizi a **mutantelor auxotrofe**, în special de aminoacizi;
2) Cunoaşterea mecanismelor fine de reglare metabolică la nivel molecular şi intervenția la acest nivel.

Ca rezultat al cercetărilor făcute, s-au stabilit fenomenele de retroinhibiție, inhibiție alosterică, locurile de blocare a diferitelor etape la mutantele auxotrofe, căile de legătură şi încrucişare a sintezei diferiților aminoacizi. Rezumând cele spuse, reiese că obținerea diferiților aminoacizi pe cale microbiologică este una din paginile strălucite ale geneticii, fiziologiei şi biochimiei microbiene contemporane.

La ora actuală producerea microbiologică de aminoacizi se realizează cu:

- tulpini sălbatice (prototrofe): acid L-glutamic, L-valină, D-L-alanină, L-glutamină, L-prolină

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- mutante auxotrofe de aminoacizi: L-lizină, L-treonină, L-leucină, L-prolină, L-ornitină, L-valină, L-citrulină, acid L-aspartic
- mutante auxotrofe de biotină: acid L-glutamic
- mutante regulatoare: L-lizină, L-treonină, L-arginină, L-metionină
- pornind de la precursori de biosinteză: L-triptofan, L-izoleucină, L-fenilalanină, L-serină, L-histidină.

2.2. Factorii care condiționează producerea microbiologică de aminoacizi

1. Cultura microbiană

După cum se vede din cele relatate mai înainte, în producția microbiologică de aminoacizi se folosesc în special mutante auxotrofe de aminoacizi sau mutante reglatoare.

Mutante auxotrofe de aminoacizi

Mutantele auxotrofe de aminoacizi se obțin din culturi bacteriene izolate din natură, care au fost testate calitativ, sau cantitativ sub raportul producerii de aminoacizi şi care se supun mutagenezei cu diferiți agenți mutageni: radiații UV, radiații γ, nitrozoguanidină.

Primele lucrări de mutageneză în acest scop s-au făcut în Japonia, pornind de la culturile bacteriene producătoare de acid glutamic. Ulterior au fost obținute, diferite mutante auxotrofe de aminoacizi, capabile să acumuleze în mediu un anumit aminoacid (Tabelul 6).

Tabel 6. Producerea de aminoacizi de către mutante auxotrofe

Aminoacidul produs	Microorganism	Markeri genetici	Producția g/l
L-Lizină	*Corynebacterium glutamicum*	Homoser$^-$	13
	Brevibacterium flavum	Thr$^-$, Met$^-$	34
	Brevibacterium lactofermentum	Homoser$^-$	20,2
L-Leucină	*Corynebacterium glutamicum*	Phe$^-$, His$^-$, Ile$^-$	16
L-Citrulină	*Bacillus subtilis K*	Arg$^-$	16,5
	Corynebacterium glutamicum	Arg$^-$	10,7
L-Ornitină	*Corynebacterium glutamicum*	Cit$^-$	26
L-Prolină	*Brevibacterium sp.*	His$^-$	23
	Corynebacterium glutamicum	Ile$^-$	14,8
L-Treonină	*Arthrobacter paraffineus*	Ile$^-$	9
	Escherichia coli	Met$^-$, Val$^-$	10,5
L-Valină	*Corynebacterium glutamicum*	Ile$^-$, Leu$^-$	30
	Arthrobacter paraffineus	Ile$^-$	9

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Principiul folosirii acestor mutante se bazează pe faptul cunoscut că, majoritatea acestor aminoacizi se obțin pe căi de biosinteză ramificate, unde, alături de aminoacidul care ne interesează se obțin şi alți aminoacizi. Avantajul folosirii acestor mutante este acela că, ele elimină ramificația care nu ne interesează, favorizând în acest mod, acumularea în mediu, numai a aminoacidului care ne interesează. Acest lucru se explică prin aceea că, aceste mutante sunt auxotrofe fie de un aminoacid, care este intermediar cheie, în calea de biosinteză a aminoacidului pe care vrem să-l obținem, intermediar aflat în apropierea punctului de ramificare, fie sunt auxotrofe de un aminoacid obținut printr-una din căile de ramificare.

În primul caz, când mutanta este auxotrofă de un aminoacid intermediar cheie, aflat în apropierea punctului de ramificare, ea are blocată activitatea primei enzime din calea ramificată, pe care vrem s-o eliminăm. Astfel, această cale este blocată şi metabolizarea merge numai pe calea obținerii aminoacidului care ne interesează şi care deci, se acumulează în mediu.

Cel mai tipic exemplu din acest punct de vedere, este producția microbiologică de lizină, care se face cu mutante auxotrofe de homoserină (Homoser $^{-}$). Homoserina este primul aminoacid care ia naştere în calea ramificată; mutantele auxotrofe de homoserină au blocată activitatea homoserin-dehidrogenazei, enzimă care inițiază calea ramificată. În acest fel, întreaga cale ramificată este blocată şi biosinteza este orientată în special spre producția de lizină.

În al doilea caz, când mutanta este auxotrofă de un aminoacid obținut pe una din căile ramificate, ea are blocată activitatea enzimei ultime, care catalizează sinteza acestui aminoacid şi astfel, se elimină ramificația corespunzătoare.

Alt avantaj al folosirii mutantelor auxotrofe de aminoacizi este că ele prezintă de cele mai multe ori şi un mecanism de reglare metabolică perturbat, de obicei, inhibiția feedback a activității unei enzime din calea comună de biosinteză, inhibiție care poate limita acumularea aminoacidului pe care vrem să-l obținem; prin această perturbare, se asigură acumularea în mediu a aminoacidului care ne interesează.

Un exemplu în acest sens, este tot în cazul producției microbiologice de lizină, unde mutantele auxotrofe de homoserină au perturbată inhibiția *feed-back* a activității enzimei aspartokinaza, din calea comună de biosinteză. Acest aspect va fi discutat mai pe larg la producția de lizină (2.4).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Stabilitatea genetică a culturii este o caracteristică importantă pentru obținerea de productivități mari. Culturile care revin spontan la tipul sălbatic (revertanții) în timpul fazei de producție sunt de nedorit în procesele industriale. Singura cale de testare a stabilității de producție a culturii, este de a constata creşterea ei în absența substanțelor pentru care este auxotrofă.

Mutante reglatoare

Mutantele reglatoare sunt mutante care şi-au pierdut o anumită cale de reglare biochimică. Ele sunt de două categorii:

- mutante rezistente la un analog al aminoacidului respectiv;
- revertanți de la mutante auxotrofe, care sunt deficiente într-o anumită enzimă reglatoare.

Cele mai interesante sunt mutantele rezistente la un analog al aminoacidului respectiv. S-a observat că unii compuşi similari structural cu aminoacizii naturali, posedă în general efecte inhibitoare asupra creşterii anumitor microorganisme. El a numit aceşti compuşi "izosteri", pentru a sublinia similaritățile lor stereochimice.

Cei mai importanți izosteri sunt analogii aminoacizilor, care funcționează ca falşi inhibitori *feedback* ai unei enzime reglatoare din calea de biosinteză a aminoacidului natural corespunzător şi de asemenea, inhibă încorporarea aminoacidului respectiv în proteină.

Cunoscându-se acest lucru, s-a presupus că mutantele rezistente la un analog al aminoacidului natural, au enzima reglatoare insensibilă la inhibiția *feedback* respectivă. Este cazul mutantelor rezistente la un analog sulfurat al lizinei: S-(2-aminoetil)-L-cisteină, obținute în 1970 de Sano şi Shiio de la *Brevibacterium flavum*. În mod normal, creşterea bacteriei *Brevibacterium flavum* este inhibată de S-(2-aminoetil)-L-cisteină. Inhibiția este intensificată în mod marcat de L-treonină şi reversată de L-lizină. Aceasta înseamnă că S-(2-aminoetil)-L-cisteina funcționează ca fals inhibitor *feed-back* al aspartokinazei, enzima regulatoare cheie din calea comună de biosinteză a lizinei. De aceea, este de aşteptat ca unele mutante rezistente la S-(2-aminoetil)-L-cisteină să fie mutante regulatoare, adică să aibă aspartokinaza insensibilă la inhibiția *feedback* concertată, exercitată de treonină şi lizină. Într-adevăr, printre mutantele rezistente la S-(2-aminoetil)-L-cisteină, s-au găsit buni producători de lizină (31 – 33 g/l), care pot creşte atât în prezența S-(2-aminoetil)-L-cisteinei, cât şi a treoninei. Aspartokinaza la aceste

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mutante este de aproximativ 150 de ori mai puțin sensibilă la inhibiția *feed-back* exercitată de lizină și treonină, comparativ cu enzima din tulpina parentală.

2. Sursa de carbon

Sursa de carbon este unul din cei mai importanți factori pentru realizarea unei bune producții de aminoacizi. Din acest punct de vedere, glucoza și zaharoza dau rezultatele cele mai bune. Dat fiind faptul că acestea sunt scumpe, în industrie se preferă melasa; deoarece unele melase dau rezultate slabe în producția de aminoacizi, datorită prezenței unor substanțe inhibitoare, este indicată testarea prealabilă a diferitelor loturi de melase, din acest punct de vedere și, alegerea celei care dă rezultatele cele mai bune. Concentrația de zahăr este de asemenea un factor important, concentrația optimă plasându-se între 5 și 15 g %.

3. Sursa de azot

Tipul sursei de azot folosite depinde în esență, de caracteristicile nutriționale ale culturii. Microorganismele auxotrofe necesită ca sursă de azot în special săruri de amoniu, sau nitrați. În plus, trebuie luate în considerare, necesitățile specifice ale culturilor mutante.

Hidrolizatele diferitelor proteine ca: făină de soia, arahide, semințe de bumbac, pot fi folosite cu succes ca sursă de azot, respectiv de aminoacizi. La producerea acidului glutamic și a lizinei, ureea este o sursă de azot foarte eficientă. Totuși, la folosirea ureei și a hidrolizatelor proteice ca sursă de azot, trebuie luate unele precauții. În cazul ureii, întrucât aceasta este degradată prin sterilizare la autoclav, se sterilizează separat, prin filtrare, și se adaugă în mod aseptic mediului de cultură. În cazul hidrolizatelor proteice, metoda de hidroliză are mare importanță pentru valoarea calitativă și cantitativă a hidrolizatului. Hidroliza acidă distruge triptofanul și, într-un grad mai mic serina și treonina. Hidroliza alcalină distruge arginina, serina, treonina, cisteina și cistina. De aceea, la alegerea hidrolizatului proteic, ca sursă de azot, trebuie ținut cont și de acest fapt, date fiind necesitățile specifice în diferiți aminoacizi ale culturilor mutante. Cantitatea optimă de sursă de azot se stabilește experimental.

4. Valoarea pH

Valoarea pH a mediului pentru obținerea de aminoacizi este situată între 6,0 și 8,0, cu un optim aproape de 7,0.

5. Temperatura

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Temperatura variază între 25^0 şi 37^0C, dar temperatura optimă trebuie determinată experimental pentru fiecare proces. De exemplu, producerea lizinei şi a acidului glutamic decurg foarte bine la 28^0C şi foarte prost la 37^0C.

6. Aerarea

Aerarea este un factor extrem de important, deoarece producerea aminoacizilor decurge cel mai bine când mediul este bine aerat. Agitarea este necesară pentru a mări gradul de aerare.

În prezent, se obţin industrial, pe cale microbiologică, acidul glutamic şi lizina. Pentru aceştia, s-au stabilit secvenţele biosintezei şi mecanismele de reglare la nivel molecular. Acelaşi lucru s-a stabilit pentru treonină, metionină şi triptofan; pentru treonină şi triptofan s-a trecut în Japonia la producţia pe cale industrială. În Japonia două mari companii se ocupă de producţia microbiană de aminoacizi: Kyowa Fermentation Industry şi Ajinomoto Company of Japan.

De fapt, în prezent, se fac cercetări în toată lumea, pentru producerea pe cale microbiologică şi a altor aminoacizi, astfel încât, se aşteaptă ca în viitor, toţi aminoacizii esenţiali şi unii neesenţiali, de care se simte mai mare nevoie, să fie produşi industrial, pe cale microbiologică. Întrucât în prezent, atât pe plan mondial, cât şi la noi în ţară, se produc pe cale microbiologică în special acidul glutamic şi lizina, în cele ce urmează ne vom referi la problemele legate de producţia acestor aminoacizi.

2.3. Acidul glutamic

Deşi acest aminoacid nu este un aminoacid esenţial pentru om, sau animale, utilizarea glutamatului monosodic (MSG) drept condiment, saù corector de gust în industria alimentară s-a răspândit atât de mult, mai ales în S.U.A. şi Japonia, încât extracţia din surse naturale nu mai ajunge să răspundă cerinţelor. De aceea, s-au căutat noi metode de obţinere a MSG; studii intense în această problemă, s-au făcut în Japonia şi S.U.A., producători pe scară întinsă de MSG.

1. Microorganisme producătoare

În 1956, în laboratorul lui Kinoshita a fost izolat un microorganism, capabil să producă glutamat într-un mediu, care conţinea glucoză şi ioni de amoniu. Acest microorganism, numit *Micrococcus glutamicus*, prezintă caracteristici comune genurilor *Corynebacterium* şi *Brevibacterium*: bacterii în formă de bacili scurţi, sau cocoidali, Gram-pozitivi, nesporulaţi, imobili, aerobi; necesită biotină ca factor esenţial de creştere; forma celulelor este adesea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

variabilă, în funcție de compoziția mediului de cultură; unul din factorii principali, care afectează forma celulelor este concentrația de biotină din mediu. Prin aceste caractere, *Micrococcus glutamicus* se încadrează în genul *Corynebacterium*, astfel încât, denumirea actualmente admisă este de *Corynebacterium glutamicum*. Alte microorganisme producătoare aparțin de asemenea genului *Brevibacterium*: *Brevibacterium flavum* şi *Brevibacterium lactofermentum*.

2. Biosinteza şi acumularea în mediu a acidului glutamic

1. Biosinteza acidului glutamic

Mecanismul general al biosintezei glutamatului din glucoză şi ioni de amoniu la *Corynebacterium glutamicum*, arată că glucoza este oxidată la citrat, iar acesta mai departe la α-cetoglutarat (prin ciclul Krebs), care prin aminare reductivă se transformă în acid glutamic. În cursul oxidării de la citrat la α-cetoglutarat, două NADP-dehidrogenaze specifice acestui microorganism acționează cuplat, în prezența ionilor de amoniu: izocitrat-dehidrogenaza şi L-glutamat-dehidrogenaza (Fig.21). Din studiile făcute, s-a stabilit că microorganismul poate folosi, pentru degradarea glucozei până la piruvat, atât calea EMP, cât şi calea pentozofosfaților (şuntul hexozomonofosfaților – HMP) (Fig.22).

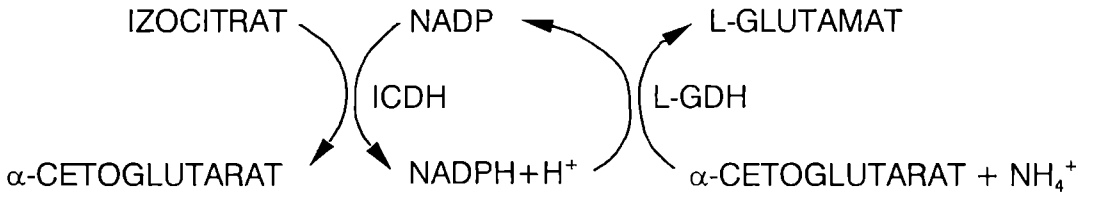


Fig.21 Cuplarea izocitrat-dehidrogenazei şi L-glutamat-dehidrogenazei în biosinteza glutamatului.

Legenda: ICDH= izocitrat-dehidrogenaza;
L-GDH= L-glutamat-dehidrogenaza

În condiții de aerare predomină şuntul HMP favorizând acumularea glutamatului; în condiții anaerobe predomină calea EMP şi în acest caz se formează acid lactic (Fig.22). De aceea, echilibrul dintre condițiile aerobe şi cele anaerobe este unul din factorii importanți care controlează producția de glutamat.

În afara condițiilor de aerare, alt factor important, care afectează cantitatea de glutamat este conținutul de biotină din mediu. Această vitamină are rol cheie în biosinteza şi acumularea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

glutamatului în mediu. S-a observat că un conținut maxim de biotină în mediu, determină o creştere maximă a microorganismului, dar descreşte cantitatea de glutamat; invers, un conținut scăzut de biotină în mediu, mergând până la deficiență de biotină, determină acumularea unor mari cantități de glutamat.

Cercetările făcute asupra funcțiilor metabolice ale biotinei, au arătat că ele sunt foarte complexe şi acoperă o varietate de reacții biochimice. S-a stabilit astfel, că echilibrul dintre calea EMP şi şuntul HMP se schimbă în raport cu conținutul de biotină din mediu. În condiții de deficiență în biotină este activat şuntul HMP, care favorizează formarea glutamatului, prin aceea că furnizează $NADPH_2$, necesar sintezei glutamatului de la α-cetoglutarat. În condiții de exces de biotină, se activează calea EMP, cu formarea de lactat din piruvat şi oxidarea ulterioară a lactatului, ceea ce diminuează producția de glutamat. Cantitatea de biotină se ajustează în funcție de concentrația de zahăr din mediu astfel: 1,5 – 2 μg/l pentru 5 g % zahăr; 2 – 3 μg/l pentru 10 g % zahăr; 4 – 8 μg/l pentru 15 g % zahăr; 7 – 10 μg/l pentru 20 g % zahăr. Pentru a putea stabili cantitaea optimă de biotină necesară producerii de glutamat, în prezent, se folosesc la producerea acidului glutamic mutante auxotrofe de biotină (Bio^-).

2. Acumularea în mediu a acidului glutamic

Dacă biosinteza acidului glutamic este influențată de o serie de factori, printre care şi biotina, acumularea în mediu a acidului glutamic este determinată şi influențată net de conținutul de biotină din mediu, această vitamină având rol cheie în acest proces. Acțiunea biotinei în acest caz, se exercită asupra permeabilității membranei plasmatice, facilitând eliminarea în mediu a glutamatului.

Ideea că acțiunea biotinei se exercită asupra permeabilității membranei plasmatice a pornit de la constatarea că acidul glutamic se poate acumula şi într-un mediu cu exces de biotină, dacă se adaugă penicilină, sau derivați ai acizilor graşi saturați cu $C_{16} - C_{18}$, ca Tween 60 (polioxietilen sorbitan-monostearat), sau Tween 40 (polioxietilen sorbitan-monopalmitat). Acțiunea lor este mai eficace când adăugarea se face în cursul fazei exponențiale de creştere.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

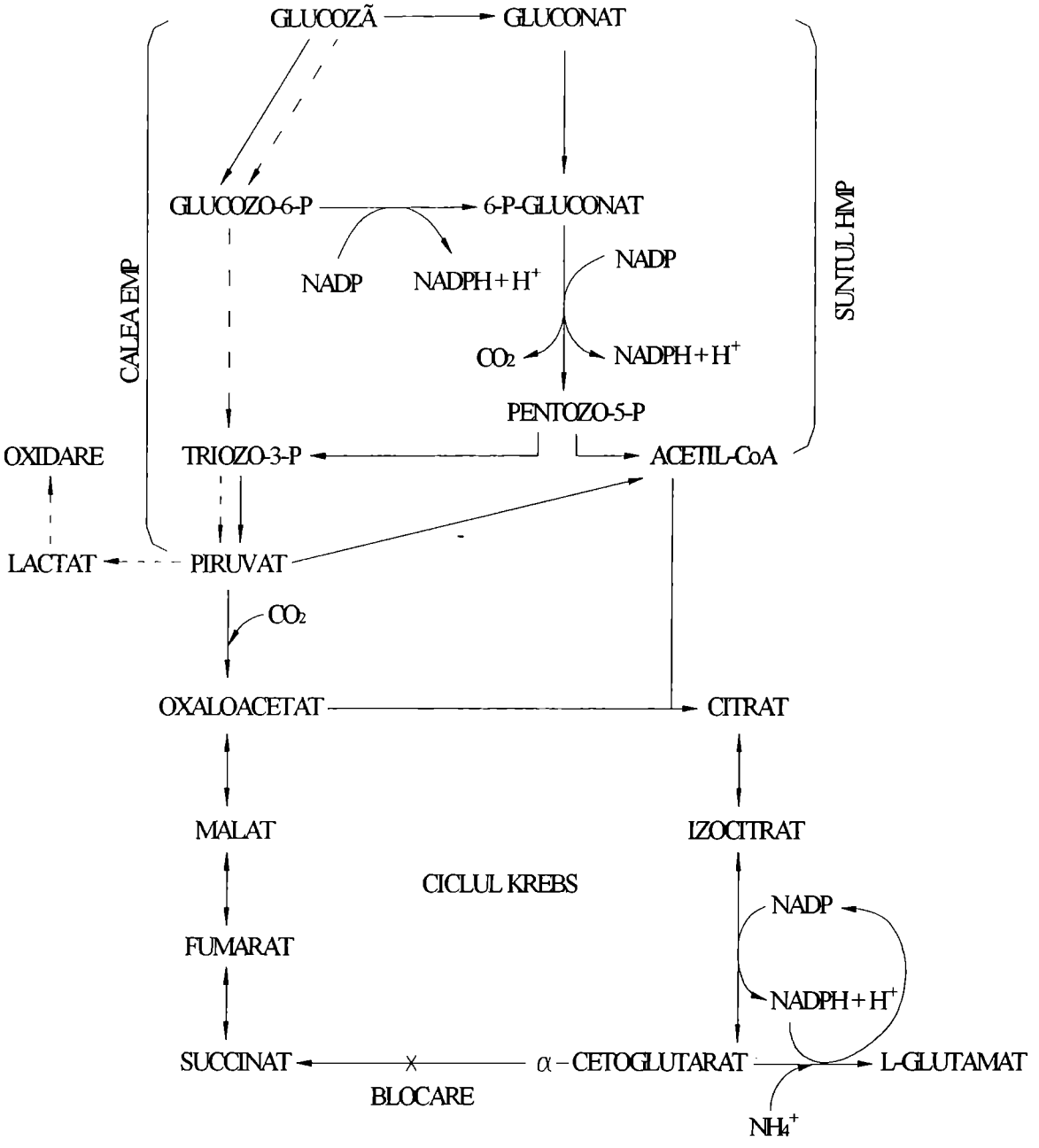


Fig. 22. Căile posibile de degradare a glucozei cu formarea glutamatului de către *Corynebacterium glutamicum*.

Legendă: Calea EMP = calea EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (ciclul glicolizei);
Suntul HMP = suntul hexozomonofosfatilor (calea pentozofosfatilor);
——→ = deficientă de biotină;
– – – → = exces de biotină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Aceste constatări au pus problema mecanismului prin care acționează biotina asupra permeabilității membranei plasmatice. Se cunoaşte faptul că biotina catalizează biosinteza acizilor graşi, în special a acizilor graşi nesaturați, care sunt componente ale fosfolipidelor din membrana plasmatică. Acest lucru se explică prin acțiunea acetil-CoA carboxilazei, enzimă care conține ca grupare prostetică biotina. Enzima participă la biosinteza oleanatului şi a altor acizi graşi nesaturați şi este inhibată de acizii graşi saturați cu $C_{16} - C_{18}$.

Pornind de la aceste fapte, o serie de cercetători japonezi au obținut mutante auxotrofe de acid oleic (Ole^-) de la *Brevibacterium thiogenitalis* cu care au reuşit să obțină acumularea acidului glutamic în mediu, independent de concentrația de biotină. Cercetările cu aceste mutante asupra rolului biotinei în mecanismele de permeabilitate celulară au stabilit următoarele:

- Biotina are funcția de a determina o anumită distribuție între acizii graşi saturați şi cei nesaturați din membrana plasmatică, distribuție de care depinde permeabilitatea acesteia şi deci, posibilitatea eliminării glutamatului în mediu.
- Acumularea extracelulară a glutamatului în cantitate mare are loc atunci când **rația molară acizi graşi saturați / acizi graşi nesaturați** din membrana plasmatică este **mai mare de 1**, adică, atunci când acizii graşi saturați se află în cantitate mai mare, decât cei saturați. Acest lucru se reflectă în tipul şi cantitatea de fosfolipide din membrana plasmatică, în sensul că, acumularea extracelulară a acidului glutamic, are loc atunci când, în membrana plasmatică scade cantitatea de **acid fosfatidic**, fosfolipid bogat în acizi graşi nesaturați şi creşte în schimb cea de **cardiolipină**, fosfolipid bogat în acizi graşi saturați.
- Insuficiența de biotină în mediu, determină o insuficiență de acizi graşi nesaturați şi respectiv de acid fosfatidic, cu creşterea în acelaşi timp a cantității de acizi graşi saturați şi de cardiolipină din membrana plasmatică, ceea ce modifică permeabilitatea acesteia, favorizând acumularea extracelulară de acid glutamic.

Aceste fapte explică şi constatările cu privire la acumularea glutamatului, independent de concentrația de biotină din mediu, în cazul folosirii derivaților acizilor graşi saturați, sau al penicilinei. Derivații acizilor graşi saturați modifică echilibrul dintre acizii graşi saturați şi cei nesaturați şi a fosfolipidelor corespunzătoare din membrana plasmatică, prin faptul că inhibă activitatea enzimei acetil-CoA carboxilaza, enzimă implicată în biosinteza acizilor graşi, în special a celor nesaturați. Acțiunea penicilinei nu se manifestă asupra membranei plasmatice, ci

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

asupra peretelui celular, inhibând sinteza acestuia; ca urmare, membrana plasmatică este supusă variațiilor de presiune osmotică, ceea ce are drept rezultat modificarea permeabilității acesteia și deci, posibilitatea acumulării extracelulare a glutamatului.

3. Reglarea biosintezei și acumulării acidului glutamic

Reglarea biosintezei și acumulării acidului glutamic a fost studiată la *Brevibacterium flavum 2247* și la unele tulpini de *Corynebacterium glutamicum*.

Tulpinile producătoare de acid glutamic trebuie să îndeplinească trei condiții, deoarece acestea reprezintă trei puncte critice pentru producerea acidului L-glutamic (Fig.23):

- ele trebuie să posede o activitate scăzută, sau inexistentă a a-cetoglutarat-dehidrogenazei, care să permită ca acidul α-cetoglutaric sintetizat, să nu poată fi transformat în acid succinic, ci să fie aminat la acid glutamic de către L-glutamat-dehidrogenază. Deci, la nivelul α-cetoglutarat-succinatului ciclul Krebs este inhibat. Oxalacetatul necesar este procurat printr-o reacție anaplerotică, care poate fi, cel mai frecvent, carboxilarea piruvatului, sau ciclul glioxilatului;
- tulpinile producătoare de acid glutamic trebuie să posede o L-glutamat-dehidrogenază insensibilă la inhibiția *feed-back* manifestată de glutamat, sau care, să fie inhibată numai la concentrații mari de acid glutamic, care nu se acumulează deobicei în mediu;
- tulpinile producătoare de acid glutamic trebuie să aibă permeabilitatea membranei plasmatice alterată, pentru a permite eliminarea și acumularea în mediu a acidului glutamic. Acest lucru se poate realiza prin folosirea unei concentrații suboptime de biotină în mediu, sau a mutantelor auxotrofe de biotină (Bio^-). Independent de concentrația de biotină din mediu, acumularea de acid glutamic se poate obține prin adaus de penicilină, sau derivați ai acizilor grași saturați, sau prin folosirea mutantelor auxotrofe de acid oleic (Ole^-).

O situație specială este aceea în care producția de L-glutamat are loc pe n-parafine. În acest caz, tulpinile auxotrofe de biotină, sau de acid oleic nu pot fi folosite, deoarece, căile de degradare ale glucozei și n-parafinelor sunt diferite. Încă din 1970, un grup de cercetători japonezi au izolat o tulpină auxotrofă de glicerol aparținând genului *Corynebacterium alkanolyticum*, defectivă în enzima L-glicerol-3-fosfat-NAPD oxidoreductaza, care poate asimila n-parafine, producând aproximativ 40 g/l glutamat, dacă se adaugă în mediu 0,01% glicerol.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

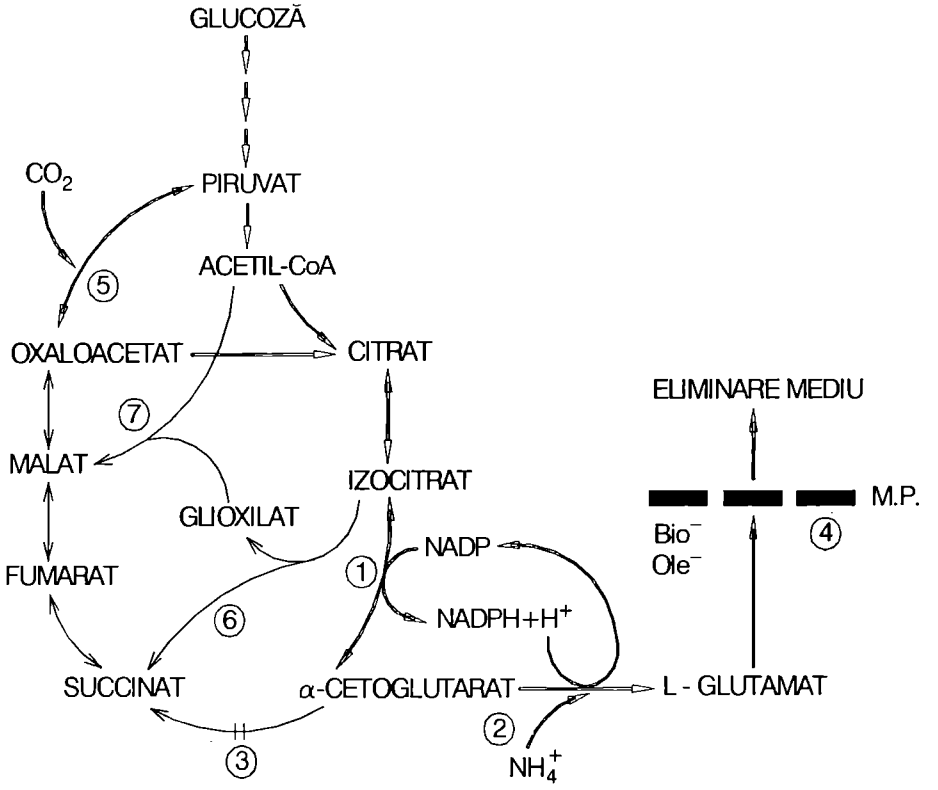


Fig. 23 Reglarea biosintezei și acumulării acidului glutamic la *Corynebacterium glutamicum*

Legenda: ① = NADP-IZOCITRAT-DEHIDROGENAZA
② = NADP-L-GLUTAMAT-DEHIDROGENAZA
③ = α-CETOGLUTARAT-DEHIDROGENAZA
④ = Alterarea permeabilității membranei plasmatice (M.P.)
⑤ = Carboxilarea piruvatului (reacție anaplerotică)
⑥ = IZOCITRATAZA
⑦ = MALAT-SINTETAZA
(Ciclul glioxilatului — reacție anaplerotică)
Bio^-, Ole^- = Mutante auxotrofe de biotină, respectiv acid oleic.
|| = Inhibarea α-cetoglutarat-dehidrogenazei
——▷ = Căi principale de sinteză
——→ = Căi secundare de sinteză

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acumularea extracelulară a glutamatului de către această mutantă, este dependentă de prezența glicerolului în mediu şi de o concentrație celulară scăzută de fosfolipide, care influențează permeabilitatea membranei plasmatice.

Pe de altă parte, tulpinile bacteriene care folosesc n-parafinele necesită în mediu tiamină, deoarece TPP este coenzima a-cetoglutarat-dehidrogenazei. Biosinteza glutamatului cu aceste tulpini este favorizată deci, de limitarea tiaminei în mediu, ceea ce are drept rezultat restrângerea producerii de α-cetoglutarat-dehidrogenază, una din condițiile esențiale pentru biosinteza glutamatului.

4. Producerea industrială a acidului glutamic

Mediul de cultură pentru producerea industrială a acidului glutamic trebuie să conțină: o sursă de carbon, reprezentată deobicei de glucoză în concentrație de 5-20 g%; o sursă de azot, reprezentată de săruri de amoniu, uree, *corn-steep*, hidrolizat de făină de soia, într-o cantitate, care să depăşească cantitatea necesară pentru conversia glucozei în acid glutamic; săruri de Ca, K, Mg ale anionilor SO_4^{2-} şi PO_4^{3-}; Fe, Zn, Mn, Co trebuie să fie sub formă de urme, la fel şi biotina.

În prezent, în locul glucozei se foloseşte melasa ca sursă de carbon, sau un amestec de glucoză, fructoză şi zaharoză, care dau rezultate chiar mai bune decât glucoza pură. Aceasta se datoreşte prezenței în melasă a acizilor organici, care au un rol beneficial dublu. În primul rând, acetatul, sau citratul pot fi convertiți în glutamat, după ce celulele se adaptează acestor surse de carbon; în cazul citratului, adaptarea implică inducția unei citrat-permeaze. În al doilea rând, creşterea în prezența citratului determină o rată mai rapidă a consumului glucozei şi prin urmare, o producție mai rapidă de glutamat, decât în cazul creşterii numai pe glucoză. Mecanismul este necunoscut, dar se pare, că este vorba de anularea represiei prin catabolit, exercitată de glucoză asupra unei enzime de la începutul ciclului Krebs.

Valoarea pH a mediului se ajustează la 6,0 – 8,0 şi se inoculează cu o cultură bine dezvoltată, în vârstă de 15-30 h, în concentrație de 2-10 % v/v. În cursul procesului, temperatura se menține la 27^0 – 30^0C, cu o bună aerare, iar valoarea pH se menține la 6,0 – 8,0 cu NH_4OH, care se adaugă continuu, în scopul orientării echilibrului în favoarea aminării reductive a acidului α-cetoglutaric. Producerea acidului glutamic în aceste condiții decurge în două faze: în prima fază (10-20 h) are loc creşterea culturii; în faza a doua are loc acumularea acidului glutamic,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

procesul fiind terminat după 30-50 h. La o concentrație de 100 g zahăr/l mediu se obțin, în aceste condiții, 50-60 g/l acid glutamic.

Producerea de glutamat pe bază de etanol, ca sursă de carbon, s-a realizat cu specii de *Brevibacterium*, obținându-se un randament de 60 g/l acid glutamic. Tulpinile care folosesc etanolul necesită biotină ca factor de creştere şi răspund la limitarea concentrației de biotină, în mod similar cu tulpinile care folosesc glucidele ca sursă de carbon.

Producerea de glutamat pe bază de n-parafine s-a realizat cu o tulpină auxotrofă de glicerol de la *Corynebacterium alkanolyticum*, obținându-se 40 g/l glutamat.

În prezent producția mondială de acid glutamic depaşeşte anual 350.000 de tone. Dintre toate țările lumii, Japonia este în fruntea producției de aminoacizi, prin cele două întreprinderi de bază: Kyowa Fermentation Industry şi Ajinomoto Company of Japan.

În țara noastră, în urma cercetărilor colectivului de microbiologie, de la secția de Biosinteze a I.C.C.F. s-a realizat producerea de acid glutamic cu *Brevibacterium lactofermentum*. Prin lucrări de mutageneză cu radiații γ, s-au obținut mutante producând până la 60 g/l acid glutamic, care au fost introduse în practica industrială la fabrica "Terapia" din Cluj.

2.3.5. Utilizările acidului glutamic

Acidul glutamic se foloseşte în medicină, în tratamentul diferitelor boli ale sistemului nervos, deoarece întreține şi ameliorează metabolismul creierului. S-a stabilit că, pentru funcționarea normală a celului nervoase a creierului, este necesar un anumit raport între conținutul de acid glutamic, acid γ-amino-butiric şi glutamină. Rezultate pozitive s-au obținut prin folosirea acestui aminoacid în tratamentul schizofreniei, epilepsiei, al urmărilor meningitei, encefalitei şi poliomielitei. Acidul glutamic ridică şi menține nivelul respirației țesutului cerebral; se crede că el absoarbe amoniacul care se formează în țesuturi, transformându-l în glutamină şi în acest mod, îndepărtează fenomenele de oboseală şi intoxicație.

Acidul glutamic se foloseşte mult în toate țările lumii în industria alimentară, drept condiment, ca mijloc de ameliorare a gustului alimentelor din carne şi legume. Adăugarea lui în cantitate de 0,1 – 0,3 % din greutatea produsului, contribuie la accentuarea gustului natural al produselor alimentare respective, făcându-le mai fine şi mai plăcute.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.4. Lizina

Acest aminoacid esențial este utilizat în cantități importante în alimentația omului şi animalelor, în vederea suplinirii carenței în lizină a alimentelor de origine vegetală. Având în vedere cererea masivă în acest aminoacid, s-a pus problema producerii pe cale industrială. Posibilitatea producerii microbiene a lizinei a fost pusă pentru prima dată în evidență între 1948-1951 la *E.coli*, din acid diaminopimelic (DAP), care este decarboxilat la lizină de către DAP-decarboxilaza.

1. Procedee de obținere

Se cunosc două procedee de obținere:

1. Sinteza în 2 etape se bazează pe obținerea de acid diaminopimelic în prima etapă, cu o mutantă de *E.coli*, din glucoză, în cultură agitată şi aerată, la pH=7,0. În a doua etapă, acidul diaminopimelic obținut, este supus acțiunii unui al doilea microorganism: *Enterobacter aerogenes*, care posedă DAP-decarboxilaza, enzimă, care produce decarboxilarea DAP la lizină. Se foloseşte în acest scop, o suspensie celulară de *Enterobacter aerogenes*, care este supusă acțiunii agenților chimici (butanol, toluen), sau fizici (ultrasunete), cu scopul eliberării enzimei.

2. Sinteza directă folosind un singur microorganism, este metoda cea mai folosită în prezent pentru obținerea pe cale industrială a lizinei, deoarece este cea mai avantajoasă. Aceasta a fost realizată de Kinoshita şi colaboratorii săi în 1958. Folosind ca agenți mutageni radiații U.V., sau radiații γ, Kinoshita a obținut o serie de mutante biochimice de la *Corynebacterium glutamicum*, toate fiind mutante auxotrofe de diferiți aminoacizi. Dintre aceste mutante, patru prezentau interes mai mare:

- o mutantă auxotrofă de homoserină şi biotină (Homoser$^-$, Bio$^-$);
- o mutantă auxotrofă de metionină (Met$^-$);
- o mutantă auxotrofă de metionină şi leucină (Met$^-$, Leu$^-$);
- o mutantă auxotrofă de izoleucină (Ile$^-$).

Dintre acestea, cea care dă rezultatele cele mai bune, sub raportul acumulării de lizină în cantitate mare, este mutanta auxotrofă de homoserină şi biotină, care a fost introdusă în practica industrială. La ora actuală, în producerea de lizină se folosesc mutante auxotrofe de homoserină, sau mutante reglatoare de la *Brevibacterium flavum* sau *Brevibacterium lactofermentum*.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. Factorii care condiționează producerea de lizină

Doi factori influențează producerea de lizină:

1. Concentrația de biotină din mediu: ceea ce deosebeşte producerea lizinei de cea a acidului glutamic, este faptul că, o acumulare remarcabilă de lizină are loc într-un mediu cu o concentrție optimă de biotină. La concentrații suboptime, se acumulează acid glutamic.

2. Concentrația de aminoacizi din mediu: lucrându-se cu mutante auxotrofe de homoserină, prezența homoserinei în mediu este esențială pentru creşterea mutantelor. Homoserina poate fi înlocuită cu o cantitate calculată de metionină şi treonină. Totuşi, un exces al celor doi aminoacizi, în special al treoninei, declanşează un mecanism represor, care diminuează considerabil cantitatea de lizină produsă. De aceea, cantitatea acestor doi aminoacizi, în special a treoninei, trebuie riguros calculată şi respectată.

3. Reglarea biosintezei lizinei

Lizina aparține familiei acidului aspartic, fiind produsă din acid aspartic, pe o cale ramificată, împreună cu treonina, metionina şi izoleucina. Calea de biosinteză este aceeaşi la toate bacteriile testate până în prezent, dar mecanismele de control metabolic diferă. În cele ce urmează, ne vom referi la reglarea biosintezei lizinei la *Corynebacterium glutamicum* şi la *Brevibacterium* sp., în comparație cu cea de la *Escherichia coli* (Fig.24).

La *Corynebacterium glutamicum* şi la *Brevibacterium* sp. există numai două puncte critice, în care biosinteza lizinei poate fi limitată:

- **aspartokinaza**, a cărei activitate poate fi inhibată printr-o inhibiție *feed-back* concertată (multivalentă) de prezența simultană a unui exces de lizină şi treonină în mediu. Nici unul din aceşti doi aminoacizi nu pot exercita această inhibiție separat, ci numai împreună (Fig.24-1);
- **devierea la homoserină**, prin homoserin-dehidrogenază (Fig.24-2)

S-au găsit trei modalități prin care, aceste două blocări pot fi eliminate printr-o singură mutație;

1. Folosirea mutantelor auxotrofe de homoserină sau homoserin-dependente (Homoser $^-$). Aceste mutante au activitatea homoserin-dehidrogenazică anulată, astfel încât, aspartat β-semialdehida nu va fi deviată la homoserină şi deci, va fi utilizată complet pentru producerea de lizină (Fig.24). Deoarece aceste mutante, necesită în mediu, pentru creştere, homoserină, care poate fi înlocuită cu un amestec de treonină şi metionină, concentrația acestor aminoacizi în

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mediu este de mare importanță, în special a treoninei, întrucât aceasta exercită o inhibiție *feed-back* a activității aspartokinazei (Fig.24).

De aceea, concentrația intracelulară de treonină este menținută scăzută, printr-o concentrație scăzută de treonină în mediu. Întrucât activitatea aspartokinazei este inhibată de prezența simultană a unui exces de lizină şi treonină în mediu, în prezența unei cantități mici de treonină, inhibiția nu mai are loc, chiar în prezența unor concentrații foarte mari de lizină.

Inhibiția *feed-back* a activității aspartokinazei, poate fi reversată de către metionină, care, intră în competiție cu treonina la situsul de legare pe aspartokinază. De aceea, raportul treonină/metionină din mediu este deosebit de important pentru producția de lizină.

2. Folosirea mutantelor sensibile la treonină sau metionină

Aceste mutante au fost izolate ca revertanți prototrofi de la o tulpină Homoser $^-$. Ele posedă o activitate homoserin-dehidrogenazică scăzută, astfel încât, aspartat-β-semialdehida va fi deviată la homoserină cu o rată redusă, fiind folosită în special pentru biosinteza lizinei.

În al doilea rând, aceste mutante sunt capabile să sintetizeze numai cantități minime de treonină internă, ele fiind sensibile la concentrații mai mari de treonină. Ca urmare, datorită insuficienței de treonină, aspartokinaza nu poate fi inhibată în activitatea ei, chiar la concentrații mari de lizină.

3. Folosirea mutantelor rezistente la un analog al lizinei: S-2-(aminoetil)-L-cisteina

Aşa cum s-a menționat anterior, aceste mutante reglatoare, posedă o aspartokinază insensibilă la inhibiția *feedback* exercitată de lizină şi treonină. În ceea ce priveşte homoserin-dehidrogenaza, la aceste mutante, activitatea acestei enzime este inhibată uşor printr-o inhibiție *feedback*, de prezența în mediu a unui exces de treonină, sau izoleucină.

Spre deosebire de *Corynebacterium glutamicum* şi de *Brevibacterium sp.*, care posedă o singură aspartokinază multivalent reglată, *Escherichia coli* posedă trei aspartokinaze (izoenzime), controlate separat de lizină, metionină şi treonină.

În plus, în căile ramificate, produsul final controlează de obicei, atât enzima inițială a căii comune, cât şi prima enzimă a ramurii specifice. Astfel, la *E. coli*, lizina inhibă nu numai aspartokinaza (prima enzimă a căii comune), ci şi dihidrodipicolinat-sintetaza (prima enzimă a ramurii specifice) (Fig.24-3). Aceasta deosebeşte net pe *E. coli* de producătorii de lizină folosiți în industrie, tip *Corynebacterium glutamicum*, la care, dihidrodipicolinat-sintetaza este insensibilă la inhibiția *feedback* exercitată de lizină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

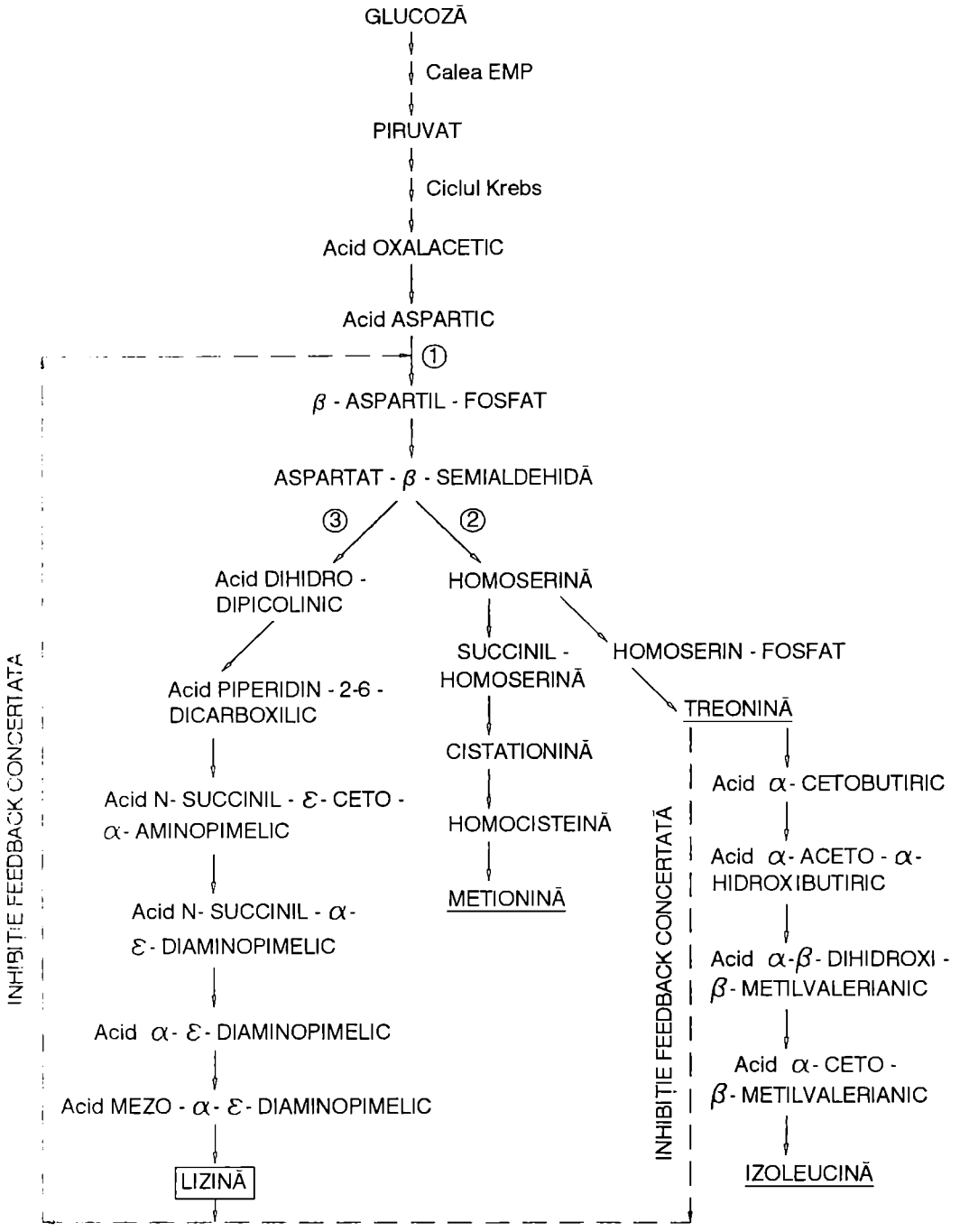


Fig. 24 Reglarea biosintezei la *Corynebacterium glutamicum* și *Brevibacterium sp.*

Legenda: ① = Aspartokinaza
② = Homoserin - dehidrogenaza
③ = Dihidrodipicolinat - sintetaza

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru producerea de lizină cu *E. coli*, ar trebui eliminate un număr mai mare de situsuri reglatoare, ceea ce este destul de dificil. De aceea, se preferă *Corynebacterium glutamicum*, sau *Brevibacterium* sp., unde printr-o singură mutație, se elimină cele două puncte critice, asigurându-se acumularea în mediu a unei mari cantități de lizină.

4. Producerea industrială a lizinei

Lizina se obține industrial, pe un mediu de cultură glucozo-mineral, în condiții de aerare şi la pH neutru. Cercetările efectuate au arătat că înlocuirea glucozei cu zaharoza măreşte producția de lizină. Din acest punct de vedere, melasa este o foarte bună sursă de carbon pentru producția de lizină. Ca sursă de azot, sulfatul de amoniu dă cele mai bune rezultate; un adaus de *corn-steep* (extract de porumb) până la concentrația de 4% măreşte de asemenea producția de lizină. Prezența biotinei şi a homoserinei (sau a unei cantități calculate de treonină şi metionină) în mediu sunt esențiale. Randamentul de biosinteză al lizinei depinde foarte mult de calitatea materiilor prime folosite şi în primul rând a melasei şi a extractului de porumb. Acestea prezintă o mare variabilitate chimică, determinată de condițiile pedoclimatice, de cultivarea sfeclei de zahăr şi porumbului, de prelucrarea lor la fabricile de zahăr, respectiv glucoză, cât şi de condițiile de depozitare.

Producția mondială de lizină depăşeşte anual 32.000 de tone, Japonia fiind pe primul loc din acest punct de vedere, deoarece a reuşit să obțină în cultură continuă 80-100 % lizină.

În țara noastră, producerea pe cale microbiologică a lizinei s-a realizat ca rezultat al cercetărilor colectivului de microbiologie de la secția de biosinteze a I.C.C.F. Între anii 1970-1972, acest colectiv a reuşit să obțină prin lucrări de mutageneză cu radiații U.V. şi cu nitrozoguanidină, o mutantă auxotrofă de biotină şi homoserină de la *Brevibacterium lactofermentum ATCC 13896*, desemnată sub denumirea de *Brevibacterium lactofermentum ICCF-3* şi care producea 35-40 g/l lizină. Procedeul a fost industrializat în 1975, la Fabrica de antibiotice din Iaşi, obținându-se 37,5 g/l lizină de uz furajer.

3. Vitamine

Vitaminele produse in cantitate mai mare de microorganisme sunt riboflavina (vitamina B_2) si vitamina B_{12}. Producerea β–carotenului (provitamina A) de catre mucegaiul *Blakeslea trispora* este de importanță secundară.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3.1. Riboflavina

Mai este numită şi lactoflavină sau vitamina B_2 si este din punct de vedere chimic 6-7 dimetil-9-(1'-D-ribitil)-izoaloxazina (Fig. 25). Numai puține microorganisme necesită o sursă exogenă de riboflavină, deşi vitamina aceasta este esențială pentru creşterea unor lactobacili şi aceste bacterii folosite pentru testarea microbiologică a riboflavinei. Totuşi, majoritatea microorganismelor sunt capabile să sintetizeze cantități suficiente de riboflavină pentru nevoile metabolice proprii. Unele microorganisme, puține de altfel, sunt capabile să sintetizeze cantități mai mari de vitamina B_2, peste nevoile proprii, eliminându-le în mediu, fiind de interes industrial.

1. Microorganisme producătoare.

Primul microorganism cunoscut ca producător de riboflavină a fost *Clostridium acetobutylicum*, bacterie folosită la producția industrială de acetonă şi butanol. În mediul fermentat, după distilarea solvenților, s-au găsit cantități apreciabile de riboflavină, care a fost folosită un timp ca sursă comercială de vitamină. Ulterior, s-au găsit alte două microorganisme, drojdiile *Ashbya gossypii* şi *Eremothecium ashbyii*, de asemenea bune producătoare de riboflavină. Sunt drojdii fitopatogene. Ambele sunt folosite în producția industrială, dar *A. gossypii* este preferată, deoarece *E. ashbyii* tinde să dea revertanți care nu produc riboflavină.

De asemenea, multe specii de *Candida* produc cantități mari de riboflavină.

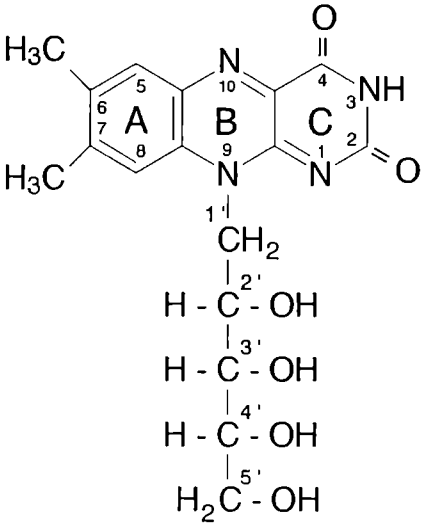


Fig. 25 Structura riboflavinei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. Mecanismul sintezei.

Nucleele A şi B ale moleculei derivă dintr-un intermediar al metabolismului purinic. Sinteza riboflavinei porneşte de la un nucleotid guaninic, probabil guanizintrifosfat (GTP). Se pare că sinteza acestei vitamine este un rezultat al producţiei excesive de purine la aceste microorganisme şi poate fi privită ca un mecanism de detoxifiere.

3. Producerea industrială

Ashbya gossypii. Majoritatea riboflavinei produsă în S.U.A. se obţine cu acest microorganism în cultură submersă. Unul din factorii importanţi este compoziţia mediului de cultură, în special în ceea ce priveşte sursa de carbon. Se folosesc glucoză, zaharoză sau maltoză purificate, deoarece materialele glucidice brute, ca melasa, determină creşterea abundentă a miceliului, dar nu favorizează producţia de riboflavină. Sursa de azot trebuie să fie organică; uzual se foloseşte *corn-steep*. Ca factori de creştere se adaugă extract de drojdie sau reziduuri de la distilarea alcoolului (*distiller's solubles*). În condiţii de aerare, la pH= 6,0-7,0 şi temperatura de 26° – 28°C, după 4-5 zile de incubare se ajunge la un randament de 6420 mg riboflavină /l mediu.

Eremothecium ashbyii dă de asemenea un randament mare de vitamină care poate ajunge la 2500 mg/l mediu. A fost folosită intens înainte de 1950, dar în prezent se preferă *Ashbya gossypii* care este mai stabilă genetic.

Candida sp. Se folosesc tulpini selecţionate de *Candida guiliermondii* şi *Candida flareri*. Cel mai important factor care controlează producţia de riboflavină de către aceste specii este conţinutul de fier al mediului, limita de toleranţă fiind de 0,04 – 0,06 mg/l. Randamentul este însă mai mic: 567 mg/l cu *C. flareri*.

Riboflavina este şi un produs secundar al fermentaţiei acetono-butilice cu *Clostridium acetobutylicum*. Reziduul după îndepărtarea solvenţilor conţine până la 97 mg/l riboflavină. Concentraţia de fier a mediului afectează producţia de riboflavină, limita de toleranţă fiind de 1-3 mg/l, motiv pentru care se folosesc vase din sticlă sau din aluminiu.

Spre deosebire de *C. acetonobutylicum* şi de speciile de *Candida*, pentru *Ashbya gossypii* şi *Eremothecium ashbyii* concentraţia de fier a mediului nu are nici o influenţă.

Extragerea vitaminei din mediu se face prin reducere cu ditionit sau cu clorură de staniu, când vitamina precipită sub forma unui compus roşu-brun. Se poate folosi şi extracţia cu solvenţi organici: soluţie 50% izopropanol sau butanol.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Majoritatea riboflavinei este folosită ca adaos în hrana animalelor. Incorporată în cantitate de 3 g/tonă alimente în hrana păsărilor sau a porcilor, măreşte rata de creştere, iar la păsări stimulează producţia de ouă şi capacitatea de clocire. Riboflavina este folosită şi pentru suplimentarea făinii, pâinii şi produselor din cereale.

3.2. Vitamina B_{12}

Se cunoştea faptul că anemia pernicioasă poate fi tratată cu extracte de ficat, dar abia în 1948, Rickes şi colaboratorii săi în S.U.A. şi E.L.Smith din laboratoarele Glaxo din Marea Britanie au reuşit izolarea din ficat a factorului anti-pernicios, pe care l-au numit vitamina B_{12}. Tot atunci s-a arătat că această vitamină este sintetizată în natură exclusiv de către microorganisme. Vitamina B_{12} se găseşte în toate ţesuturile animale, dar în concentraţii foarte mici; în ficat, de exemplu, este de aproximativ 1ppm. Organismele animale îşi procură vitamina B_{12} necesară numai din hrană, deoarece cea sintetizată de microorganisme în intestinul gros nu poate fi asimilată.

Deoarece concentraţia de vitamină B_{12} din ţesuturile animale este prea mică pentru o producţie comercială, iar sinteza chimică este imposibilă, întrucât necesita 70 de trepte de reacţie, producţia de vitamină B_{12} se face la ora actuală exclusiv pe cale microbioloigcă. Cele mai importante firme producătoare sunt: Farmitalia S.p.A. (Italia); Glaxo Lab. Ltd. (Anglia); Merck Co. Inc. (S.U.A.); Rhone Poulenc S.A. (Franţa); Roussel UCLAF (Franţa); G. Richter Pharmaceutical Co. şi Chinoin (ambele din Ungaria).

1. Structură

Studiile chimice au arătat că nu este o singură vitamină B_{12}, ci o întreagă familie de vitamine înrudite chimic (Fig. 26), cu efecte diferite asupra creşterii la animale. Structura de bază a vitaminei B_{12} este un nucleu tetrapirolic, asemănător cu nucleul porfirinic din clorofilă şi hemoglobină, cu deosebirea că lipseşte puntea metinică (=CH-) dintre nucleele A şi D (Fig. 26). Toate vitaminele B_{12} conţin cobalt legat de nucleul tetrapirolic amintit, complexul respectiv purtând numele de **cobinamidă** (fig. 26). Prin unirea cobinamidei cu fosfatul şi riboza se obţine o **cobamidă**. Toate cobamidele sunt săruri, şi anume, la C-1 al ribozei se leagă o bază heterociclică, care care pentru vitamina B_{12} propriu-zisă este 5-6-dimetilbenzimidazol (Fig. 26) La atomul de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

cobalt se găseşte legată şi o grupare –CN, astfel încât, din punct de vedere chimic vitamina B_{12} din ficat este **ciano-5-6-dimetil α–benzimidazolil-cobamidă**, sau prescurtat, **cianocobalamină**.

Celelalte vitamine B_{12} se deosebesc prin radicalul legat de atomul de cobalt, care poate fi: -OH sau $–CH_3$, în locul –CN, sau prin baza heterociclică legată de riboză, care poate fi o purină în locul 5-6-dimetilbenzimidazolului. Totuşi s-a constatat că acestea sunt mai puţin biologic active la vertebrate, decât vitamina B_{12} propriu-zisă (din ficat).

Mai trebuie menționat şi faptul că la multe microorganisme, ca de exemplu bacteriile propionice, vitamina B_{12} se află în celule sub formă de coenzimă, având un rest de adenină legat de atomul de cobalt. La prelucrarea celulelor microbiene, coenzima B_{12} legată de celule este eliberată prin acidifiere sau alte metode şi prin adaus de KCN este transformată în cioanocobalamină, respectiv vitamina B_{12}.

2. Microorganisme producătoare

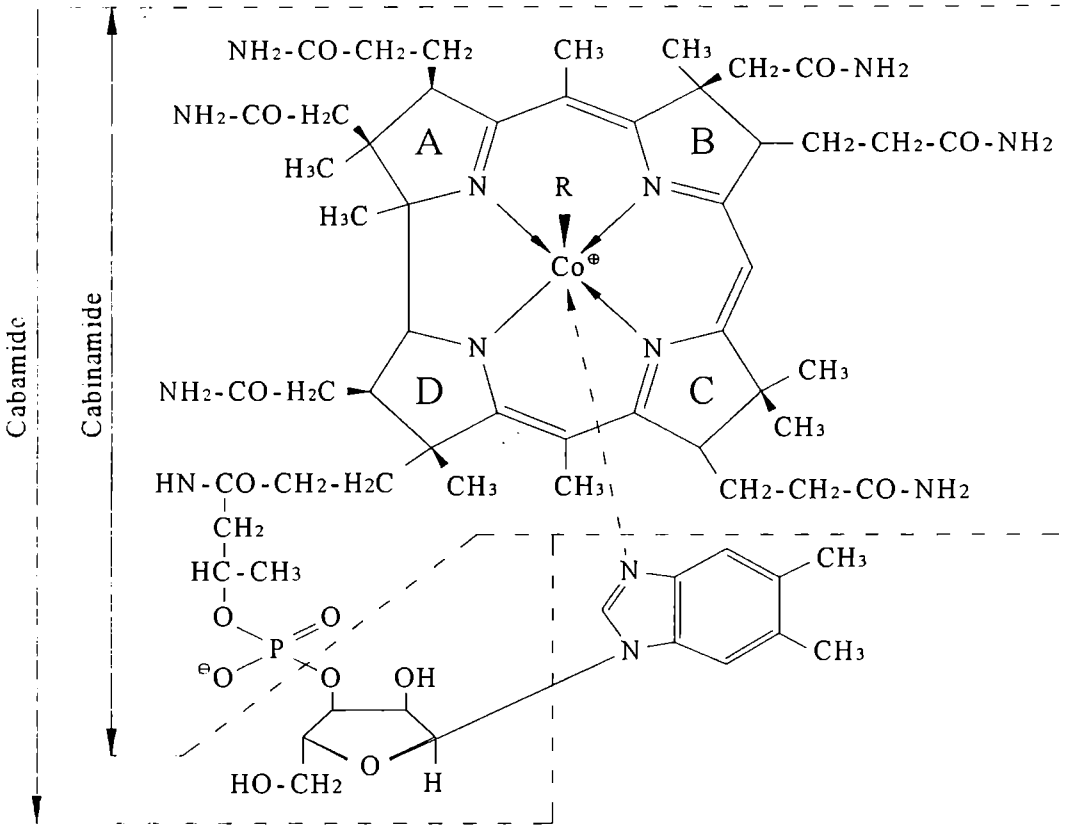
Inițial această vitamină a fost izolată din mediile de cultură ale lui *Streptomyces griseus*, unde apare ca produs secundar la producția de streptomicină, în cantitate de 2 mg/l.

În cantitate puțin mai mare (3,3 mg.l) se întâlneşte la *Streptomyces olivaceus*. Totuşi, cele mai mari cantități de vitamină s-au obținut cu bacterii propionice: *Propionibacterium freudenreichii* (19 mg/l) şi *Propionibacterium shermanii* (23 mg/l) şi cu *Pseudomonas denitrificans* (60 mg/l).

3. Biosinteză

Biosinteza vitaminei B_{12} merge paralel cu biosinteza clorofilei şi a hemoglobinei până la uroporfirinogen III. Structura de bază de la care porneşte sinteza este acidul δ-aminolevulinic format prin condensarea succinil-coenzimei A cu glicina şi decarboxilarea succinilglicinei rezultate (Fig. 27). Reacția este catalizată de piridoxal-fosfat şi necesită biotină drept cofactor. Condensarea a două molecule de acid δ-aminolevulinic formează porfobilinogen şi apoi, condensarea a patru molecule de porfobilinogen, probabil sub influența unei porfobilinogen dezaminaze duce la apariția unui tetrapirol linear, numit uroporfirinogen III (Fig. 27). Acest intermediar este comun atât pentru sinteza cianocobalaminei, cât şi a sistemului porfirinic din clorofilă, hem şi citocromi. Conversia uroporfirinogen III în vitamină B_{12} nu este încă bine cunoscută. In orice caz, în final, prin biosinteză se obține coenzima vitaminei B_{12}, adică 5'-deoxiadenozil-cobalamina, care în urma prelucrării se transformă în cianocobalamină, respectiv vitamina B_{12}.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



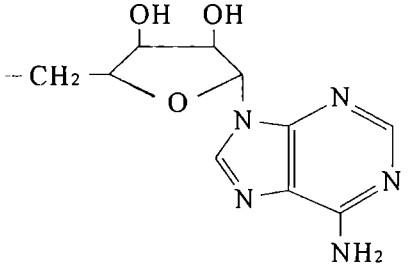
R	Compus
-CN	Vitamina B_{12} (Ciancobalamina)
- OH	Vitamina B_{12a} (Hidroxocobalamina)
-CH3	Metilcobalamina
	Coenzima B_{12} (5' - Deoxiadenozil-Cobalamina, Cobanamida)

Fig. 26 Structura cobalaminelor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

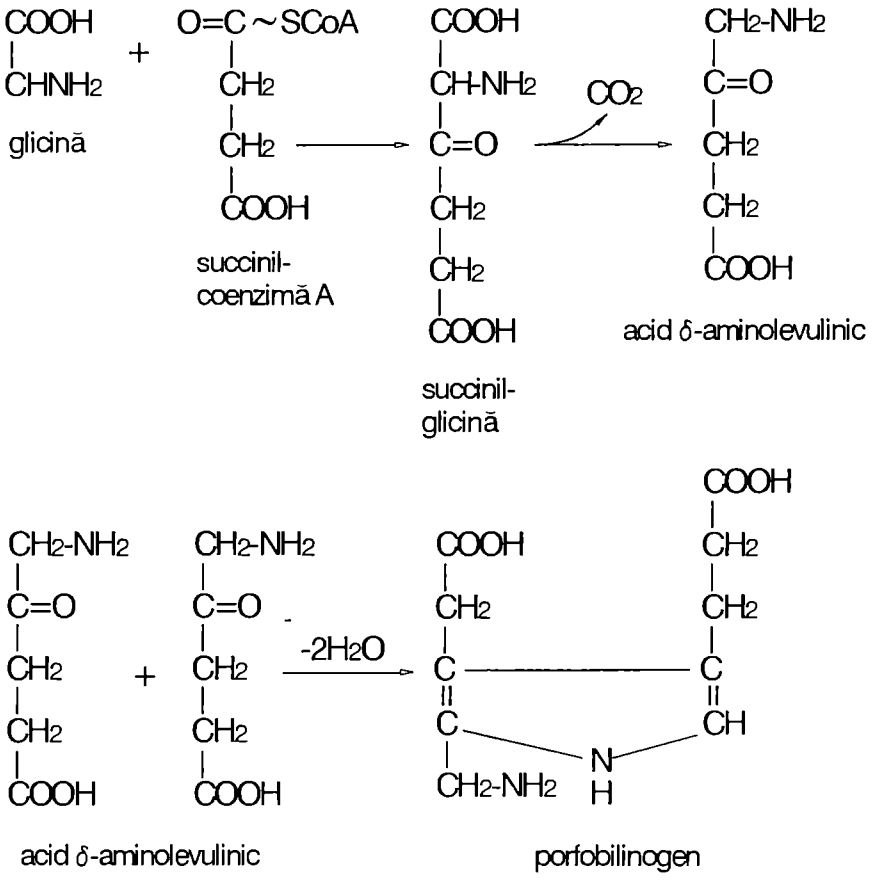


Fig. 27 - Sinteza porfobilinogenului

4. Producere industrială şi importanţa practică

Mediul de cultură pentru producţia de vitamină trebuie să conţină glucoză sau zaharoză ca sursă de carbon, iar ca sursă de azot, făină de peşte, *corn-steep* sau reziduuri de la distilarea alcoolului. Adăugarea de cobalt în cantitate de 10 – 100 mg/l şi de 5-6-dimetilbenzimidazol stimulează producţia. Dacă se lucrează cu bacterii propionice (*Propionibacterium freudenreichii* şi *Propionibacterium shermanii*) procesul are loc în două stadii: în prima fază, anaerobă, care durează 2-4 zile se formează 5'-dezoxiadenozilcobinamida, în faza a doua, aerobă, care durează 3-4 zile se formează 5'-dezoxi-adenozilcobalamina (coenzima vitaminei B_{12}). Dacă se lucrează cu *Pseudomonas denitrificans* procesul are loc într-un singur stadiu şi se obţine un randament mai mare (60mg/l).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

S-a constatat că adăugarea de betainǎ determină creşterea randamentului; ca sursă de betainǎ se foloseşte melasa de sfeclă. Deşi modul de acţiune este necunoscut, betaina determină o activare a biosintezei, sau o creştere a permeabilităţii membranei plasmatice.

Vitamina B_{12} este esenţială pentru creşterea normală la om şi animale domestice ca porci şi păsări, ceea ce explică producerea ei pe scară largă. Producţia mondială anuală este de aproximativ 10.000 kg din care, o parte este folosită în industria farmaceutică, iar restul în hrana animalelor. Adăugarea de 10-15 mg vitamină B_{12} la tona de nutreţuri, îmbunătăţeşte mult calităţile nutritive ale proteinelor vegetale şi determină o utilizare crescută a acestora de către păsări şi porci.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL V
METABOLIȚI SECUNDARI

În categoria metaboliților secundari intră o serie de substanțe de mare importanță practică şi anume:

1. **antibioticele**, substanțe produse de unele microorganisme, având acțiune antimicrobiană asupra altor microorganisme, în sensul că fie inhibă multiplicarea acestora (**acțiune microbiostatică**), fie le omoară (**acțiune microbicidă**);
2. **alcaloizii din ergot** (cornul secarei) produşi de ciuperca *Claviceps purpurea*, cu acțiune asupra musculaturii netede a uterului, a vaselor de sânge şi asupra sistemului nervos vegetativ;
3. **gibereline**, substanțe produse de ciuperca *Gibberella fujikuroi*, cu acțiune de fitohormoni, în sensul că favorizează diferite procese de dezvoltare a plantelor ca: gradul de creştere, germinarea, înflorirea, creşterea fructelor;
4. **micotoxine**, ca de exemplu **aflatoxina** produsă de *Aspergillus flavus*, cu acțiune mutagenă şi cancerigenă.

Având în vedere importanța lor practică deosebită, în cele ce urmează, vor fi tratate numai antibioticele.

ANTIBIOTICELE

Deşi descoperirea primului antibiotic, **penicilina**, a fost făcută în 1929 de către A. Fleming, producerea ei industrială a început abia în 1943, fiind urmată în 1946 de cea a **streptomicinei**. De la această dată, marele număr de cercetări teoretice şi practice făcute în acest domeniu, au dus la descoperirea unui număr considerabil de antibiotice. Cu toate acestea, numai un număr limitat dintre ele fac actualmente obiectul producției industriale. Aceasta deoarece, un nou antibiotic, pentru a fi trecut în practica medicală, în afară de o acțiune antimicrobiană satisfăcătoare asupra microorganismelor patogene, trebuie să mai îndeplinească următoarele condiții:

- absență de toxicitate;
- solubilitate în apă la un pH convenabil;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- stabilitate;
- absența compușilor pirogeni și a celor histaminici;
- o bună toleranță;
- absența efectelor secundare asupra celulei, serului, hematiilor, leucocitelor.

Microorganismele producătoare de antibiotice aparțin **bacteriilor**, și dintre acestea, în special **actinomicetele**, cu genul *Streptomyces*, precum și unele bacterii din genul *Bacillus* și **fungilor microscopici**, în special **mucegaiurile** cu genurile *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*.

Producția industrială de antibiotice se efectuează în prezent exclusiv pe cale microbiologică, cu excepția **cloramfenicolului**, a cărui structură relativ simplă, permite sinteza chimică la un preț avantajos.

1. Etapele producerii unui antibiotic

1.1. Izolarea microorganismelor producătoare

Izolarea microorganismelor producătoare de antibiotice este prima etapă cu care se începe producția unui antibiotic. Aceasta se face în laborator, prin tehnicile obișnuite dintre care, cele mai folosite sunt două:

- **testarea microorganismului potențial producător de antibiotic, față de mai multe microorganisme test**. În acest scop, se însămânțează microorganismul potențial producător de antibiotic, pe o placă cu mediu agarizat în placă, sub forma unui striu, la un capăt al plăcii. După ce acesta s-a dezvoltat, pe aceeași placă, se însămânțează diferite microorganisme test, patogene și nepatogene, tot sub formă de striuri, în unghi drept, față de striul microorganismului potențial producător. Dacă acesta va produce un antibiotic activ împotriva unui microorganism test, atunci, acesta nu se va dezvolta în apropierea striului microorganismului producător, formându-se o zonă de inhibiție a creșterii.
- **testarea mai multor microorganisme potențial producătoare de antibiotic, față de un singur microorganism test**. În acest scop, se îmbibă discuri de hârtie de filtru, în mediul lichid în care a crescut microorganismul presupus producător de antibiotic și se plasează pe suprafața unei plăci cu mediu agarizat, însămânțat în pânză cu microorganismul test. Dacă mediul conține un antibiotic activ împotriva microorganismului test, atunci, după incubare, discurile de hârtie de filtru vor fi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

înconjurate de zone de inhibiție a creşterii, contrastând cu restul plăcii, unde cultura se dezvoltă pe toată suprafața.

1.2. Studii asupra antibioticului produs

Aceste studii se fac în laborator şi în stația pilot. În laborator se fac următoarele studii:

- **studii analitice** asupra proprietăților fizice şi chimice, stabilității, impurităților (substanțe pirogene şi histaminice), stabilirii dacă antibioticul este nou, sau este identic cu unul cunoscut (prin cromatografie);
- **studii farmacologice** asupra activități antimicrobiene şi puterii antibiotice, asupra toxicității acute, sau cronice asupra organismului animal, asupra rezistenței microorganismelor la antibioticul respectiv, asupra modului de acțiune şi eventuale acțiuni sinergice, asupra sterilității;
- **studiul condițiilor optime de producere**; compoziția mediului, temperatură, pH, aerare, durată, antispumanți;
- **studiul metodelor de izolare şi purificare.**

În stația pilot se perfectează apoi aceşti parametri, în vederea obținerii unei cantități maxime de antibiotic.

Dacă toate aceste teste dau rezultate bune şi dacă s-au perfectat toți parametri de producție, se poate trece la stadiul industrial propriu-zis.

1.3. Producerea industrială

Producția industrială începe de obicei în laborator unde se pregăteşte inoculul. Deoarece laboratorul este separat de fabrică, transferul aseptic al inoculului pune unele probleme. Se foloseşte în acest scop un recipient metalic special, numit *bazooka*. Transferul inoculului în acest aparat, sterilizat cu grijă, se face în laborator, într-o cameră sterilă. Acest bazooka este transportat apoi în fabrică şi legat aseptic cu bioreactorul de inoculat. În acest moment, un curent de aer steril introduce inoculul în bioreactor. Evoluția procesului este urmărită prin luarea de probe în mod steril, la intervale regulate.

Producerea unui antibiotic durează între 3-10 zile, după care, mediul este transferat la secția de extracție. Primul stadiu constă din separarea corpilor microbieni de mediu. Stadiul următor este separarea antibioticului din mediu, pentru care se folosesc diferite metode ca: extracție cu solvenți organici, precipitare, tratare cu răşini schimbătoare de ioni, distilare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Antibioticele astfel izolate sunt supuse altor tehnici de purificare specială, sunt sterilizate şi apoi supuse controlului analitic.

1.4. Determinarea puterii antibiotice

Antibioticele purificate trebuie titrate în scopul determinării puterii lor antibiotice. Cea mai cunoscută metodă este difuzia în agar. Aceasta constă în a depune pe suprafaţa unui mediu agarizat, aflat într-o placă Petri, care a fost însămânţat cu microorganismul testat, discuri de hârtie de filtru, îmbibate în soluţia de antibiotic. Diametrul zonelor de inhibiţie a creşterii, care apar în jurul discurilor de hârtie de filtru, după incubare, permite măsurarea puterii antibioticului respectiv şi aceasta va fi comparată cu diametrul zonelor de inhibiţie produse de o soluţie standard de antibiotic. Activitatea antibioticelor este în general exprimată în unităţi raportate la miligram de produs. Ex: penicilina:1,670U/mg; polimixina:7,700U/mg; bacitracina: 52,1U/mg. Dacă pentru unele antibiotice unitatea de activitate este aproximativ egală, sau chiar egală cu 1μg, pentru altele, unitatea de activitate se depărtează considerabil de această valoare. De exemplu, în cazul penicilinei 1 unitate de activitate=0,6 μg penicilină.

2. Clasificarea antibioticelor

În afară de clasificările bazate pe microorganismele producătoare (bacterii, fungi), sau cele bazate pe proprietăţile antibiotice (bacteriostatice, bactericide, fungistatice, fungicide), cea mai raţională clasificare este în funcţie de structura lor chimică (Tabel 7).

Majoritatea antibioticelor enumerate sunt bacteriostatice sau bactericide. Excepţie fac grizeofulvina, nistatina şi amfotericina B care sunt antifungice.

3. Modul de acţiune al antibioticelor

3.1. Blocarea sintezei proteinelor

Acest lucru se realizează pe două căi:

- **Inhibarea transcrierii informaţiei genetice de la ADN la ARNm**, cazul rifamicinei.
- **Perturbarea traducerii informaţiei genetice la nivelul ribozomilor**, cazul antibioticelor: cloramfenicol, streptomicină, neomicină, kanamicină, gentamicină, tetracicline, eritromicină, oleandomicină, spiramicină şi tilozină. Cloramfenicolul de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

exemplu, interferă cu legarea ARNm la ribozomi; tetraciclinele inhibă formarea complexului necesar între ribozomi ARNm şi aminoacil-ARNt, probabil prin inhibarea reacţiei de legare a aminoacil-ARNt.

-

Tabel 7: Clasificarea antibioticelor în funcţie de structura lor chimică.

Clasa de antibiotice	Subclasa	Exemple de antibiotice	Microorganisme producătoare
I. Formate din aminoacizi sau analogi peptidici	Oligopeptide: -antibiotice β-lactamice	Peniciline Cefalosporine Carbapeneme Cicloserina	*Penicillium chrysogenum* *Cephalosporium acremonium* *Streptomyces clavuligenes* *Streptomyces cattleya* *Streptomyces fulvoviridis* *Streptomyces orchidaceus*
	Polipeptide: - - chromopeptide - depepsipeptide	Bacitracina Gramicidina Polimixine Actinomicina Valinomicina	*Bacillus subtilis* *Bacillus licheniformis* *Bacillus brevis* *Bacillus polymyxa* *Streptomyces sp.* *Streptomyces sp.*
II. Compuşi glicozidici	Aminoglicozide Glicopeptide Glicolipide	Streptomicina Kanamicina Gentamicicna Spectinomicina Neomicina Tobramicina Vancomicina Moenomicina	*Streptomyces greiseus* *Streptomyces kanamyceticus* *Micromonospora purpurea* *Streptomyces spectabilis* *Streptomyces fradiae* *Streptomyces tenebrarius*
III. Lactone macrociclice	Macrolide Ansamicine Poliene Oxazolidinone	Eritromicina Spiramicina Oleandomicina Rifamicina Nistatina Amfotericina B Oxazolidinone	*Streptomyces erythreus* *Streptomyces ambofaciens* *Str. oleandomyceticus* *Streptomyces antibioticus* *Nocardia mediteranei* *Streptomyces noursei* *Streptomyces sp.* *Streptomyces sp.*
IV. Chinone	Tetracicline Benzochinone	Tetracicline Mitomicine	*Streptomyces aureofaciens* *Streptomyces rimosus* *Streptomyces caespitosus*
V. Compuşi aromatici	Derivaţi din benzen Nuclee aromatice condensate Eter aromatic	Cloramfenicol Griseofulvină Novobiocină	*Streptomyces venezuelae* *Penicillium patulum* *Penicillium griseofulvin* *Streptomyces sphaeroides*
VI. Compuşi quinolonici	Quinolone Fluoroquinolone	Acid nalidixic Norfloxacin	*Streptomyces sp.* *Streptomyces sp.*
VII. Compuşi alifatici ciclici	Cicloalcani	Cicloheximida	*Streptomyces griseus*
VIII. Compuşi steroidici		Acid fusidic	*Fusinium coccineum*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Streptomicina deformează situsul unde are loc unirea aminoacil-ARNt şi ARNm şi aceasta poate induce formarea de molecule proteice defective. La fel reacţionează şi neomicina, kanamicina şi gentamicina.

Alte antibiotice care acţionează în acelaşi mod sunt puromicina, care, fiind un analog al aminoacil-ARNt, îi inhibă transferul la ribozomi, cicloheximida (actidiona) cu acţiune similară cu a cloramfenicolului şi acidul fusidic.

3.2. Blocarea sintezei şi funcţiilor peretelui celular: peniciline, cefalosporine, bacitracina, novobiocina, cicloserina.

De exemplu, bacitracina inhibă enzima glicopeptid-sintetaza, care este responsabilă de condensarea catenei glicopeptidice a peretelui celular. Penicilinele şi cefalosporinele împidică formarea legăturilor transversale ale glicopeptidului.

3.3.Perturbarea funcţiilor membranei plasmatice: streptomicina, polimixine, gramicidina, nistatina, amfotericina B, grizeofulvina. Polimixinele de exemplu, acţionează ca un detergent cationic, cu afinitate pentru radicalii fosfat din membrana plasmatică, producând eliminarea lor din structura ei şi ducând în final la liza celulei. Gramicidina afectează funcţiile energetice ale membranei plasmatice. Nistatina, amfotericina B şi grizeofulvina acţionează la nivelul sterolilor din membrana plasmatică, modificându-i permeabilitatea.

3.4. Blocarea sintezei acizilor nucleici: ADN sau ARN

În această categorie intră antibioticele cu acţiune antimitotică, deci antitumorală marcată ca mitomicina C, care inhibă sinteza ADN şi actinomicinele care inhibă sinteza de ADN şi ARN.

4. Utilizările antibioticelor

Cea mai importantă utilizare este în tratamentul diferitelor maladii provocate de agenţii microbieni infecţioşi. Din acest punct de vedere, antibioticele se clasifică ţinând seama de întinderea activităţii lor în: antibiotice cu spectru restrâns, intermediar sau larg de activitate.

Antibioticele cu **spectru restrâns** de activitate sunt limitate la acelea care sunt active numai contra bacteriilor Gram-pozitive, în special coci. Aşa este penicilina G, activă contra

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

infecţiilor cauzate de pneumococi, streptococi şi stafilococi. În aceeaşi categorie intră eritromicina şi bacitracina.

Antibioticele cu **spectru intermediar** de activitate sunt active în plus faţă de cocii Gram-pozitivi şi contra unor bacterii Gram-negative. În această categorie intră: streptomicina, neomicina, kanamicina, gentamicina şi cefalosporinele.

Antibioticele cu **spectru larg** de activitate sunt active într-o varietate de infecţii cauzate atât de bacterii Gram-pozitive, cât şi de bacterii Gram-negative. În această categorie intră tetraciclinele şi cloramfenicolul.

Dintre antibioticele antifungice, grizeofulvina este activă în infecţiile superficiale ale pielii cauzate de specii de *Tricophyton, Microsporum şi Epidermophyton*; amfotericina B este folosită în tratamentul micozelor profunde produse de: B*lastomyces dermatidis, Histoplasma capsulatum var. capsulatum, , Cryptococcus neoformans, Coccidioides immitis;* nistatina este folosită în infecţiile cu *Candida sp.* ale tractului digestiv şi vaginal.

Un alt domeniu de utilizare a antibioticelor este zootehnia, fie pentru prevenirea bolilor, fie pentru îmbunătăţirea creşterii în greutate şi a alimentaţiei în crescătoriile de animale şi păsări. Pentru prevenirea îmbolnăvirilor se adaugă 50-250g antibiotice la tona de alimente. Antibioticele folosite în acest scop sunt clortetraciclina şi oxitetraciclina.

Pentru îmbunătăţirea creşterii în greutate se adaugă 1-50g antibiotic la tona de alimente. Antibioticele folosite în acest scop sunt: clortetraciclina, oxitetraciclina, bacitracina, procain-penicilina G, streptomicina. Creşterea în greutate este un rezultat al modificării microbiotei intestinale a animalelor şi păsărilor tratate.

5. Descrierea principalelor antibiotice

5.1. Penicilinele

Penicilina este primul antibiotic introdus în terapeutică şi este activ contra bacteriilor Gram-pozitive, în special coci Gram-pozitivi. Cu toate că s-au descoperit multe antibiotice, penicilina ocupă şi în prezent primul loc în terapeutică, datorită şi faptului că este netoxică pentru om.

1. Selecţia tulpinilor înalt producătoare

Acest antibiotic este produs de numeroase specii de *Penicillium.* Tulpina lui Fleming, identificată ca *Penicillium notatum* nu producea decât 6mg/l penicilină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În urma cercetărilor întreprinse la Peoria, Illinois în S.U.A., în 1943 s-a izolat o nouă specie *Penicillium chrysogenum,* notată cu NRRL-1951, care producea 60mg/l. Aceasta a constituit tulpina de plecare asupra căreia şi-au concentrat atenţia patru echipe de cercetători din diferite institute ale S.U.A., urmărind mărirea randamentului de penicilină şi dispariţia pigmentului galben, chrysogenina, care complică foarte mult operaţiile de extracţie şi purificare.

Astfel, la PEORIA, pornind de la tulpina NRRL-1951, prin selecţia unor variante spontane s-a izolat tulpina NRRL-1951-B25 care producea 150mg/l penicilină. Această tulpină a fost preluată de altă echipă de cercetători de la Institutul Carnegie din Washington şi de la Universitatea din Minnesota, care, prin mutageneză cu radiaţii X au obţinut tulpina notată cu X-1612 care producea 300mg/l penicilină. Acestă tulpină a fost preluată de echipa de cercetători de la Universitatea din Wisconsin, care prin mutageneză cu radiaţii U.V. au obţinut tulpina Wis Q-176, care producea 550mg/l penicilină. Folosind în continuare mutageneza cu radiaţi U.V. au obţinut tulpina WisB13-D10 lipsită de pigmentul galben chrysogenină. În continuare, lucrând pe această tulpină, fie prin selecţie spontană, fie folosind ca agent mutagen azot-iperita (nitrogen mustard) au obţinut în final tulpina Wis 51-20 care producea 1510mg/l penicilină. Această tulpină a fost preluată de echipa de cercetători ai firmei Eli Lilly Industries, care prin lucrări de mutageneză cu azot-iperită au obţinut în final tulpina E15.1 care producea 7g/l penicilină (Fig.28). În prezent, în urma eforturilor de selecţie şi a perfecţionărilor tehnice s-a ajuns în industrie la o producţie mai mare de 20g/l penicilină.

2. Tipuri de peniciline

S-a constatat că speciile de *Penicillium* produc mai multe tipuri de peniciline, toate având un nucleu comun şi deosebindu-se prin catena laterală fixată în poziţia 6, prin intermediul unei funcţii amidice. Nucleul comun este acidul *6-aminopenicilanic*, care ia naştere prin condensarea a trei aminoacizi: *acidul α-aminoadipic*, *L-cisteina* şi L-*valina*. Acidul 6-aminopenicilanic cuprinde două nuclee: un nucleu *β-lactam* şi un nucleu *tiazolidinic* (Fig.29).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

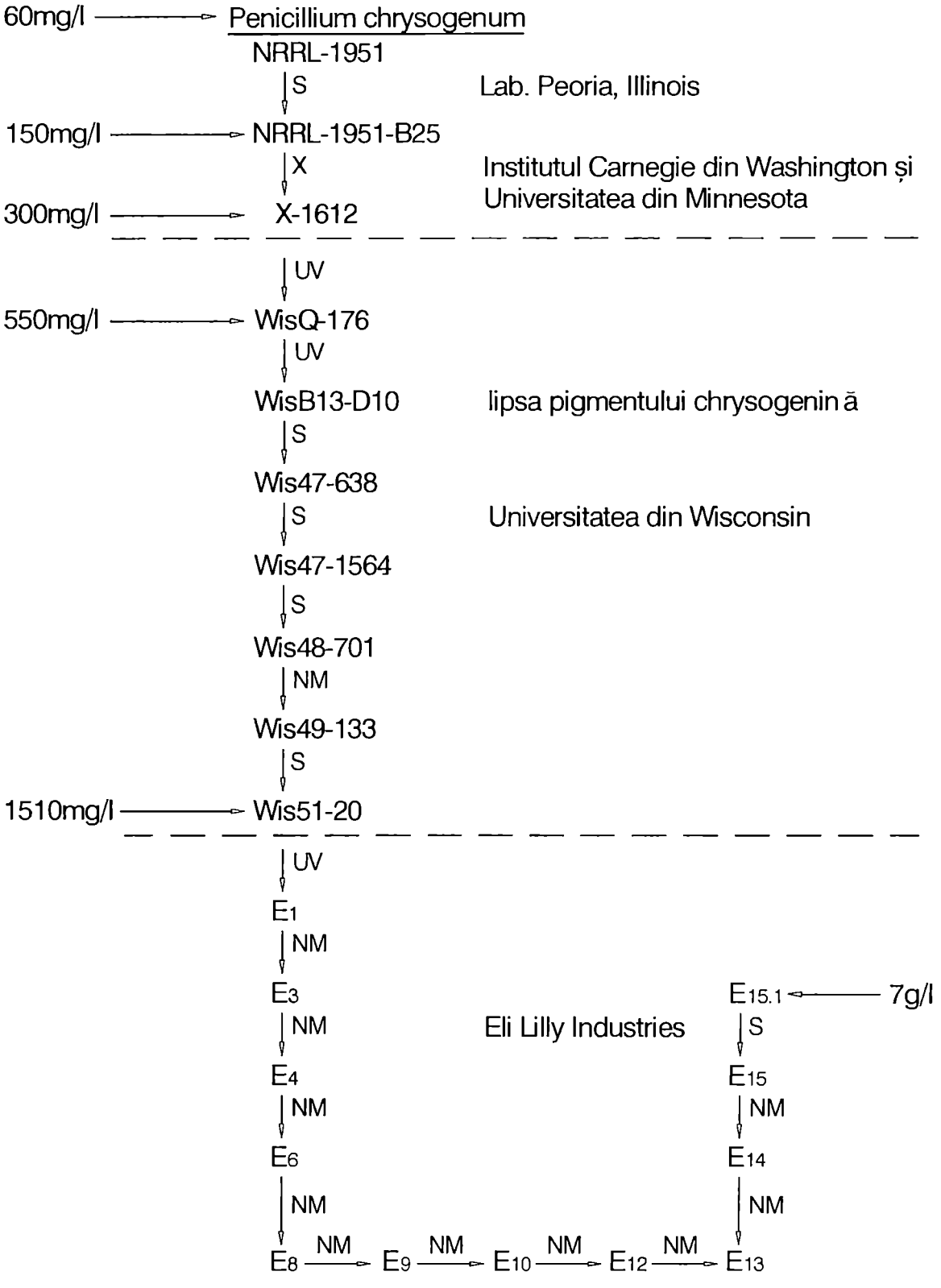


Fig. 28 Selecția tulpinilor înalt producătoare de penicilină

Legenda: S = selecție prin mutație spontană
X = radiații X
UV = radiații UV
NM = azot-iperită (nitrogen mustard)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

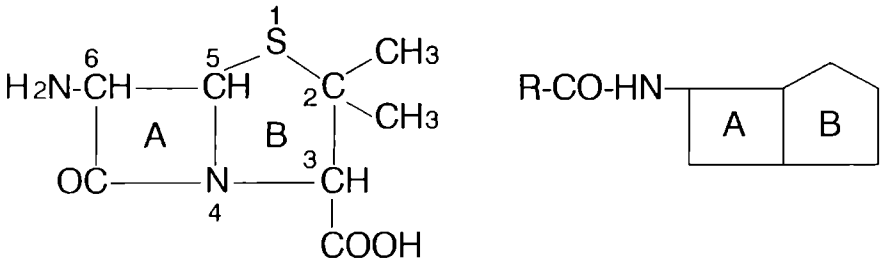


Fig. 29 Acidul 6-aminopenicilanic (formula chimică și schema)

Legenda: A=nucleu β-lactam
B=nucleu tiazolidinic
R=radical

La gruparea NH_2 a acidului 6-aminopenicilanic se fixează prin intermediul unei funcții amidice (CO) un radical (R). După natura acestui radical se deosebesc diferitele tipuri de peniciline, astfel:

R=benzil → benzilpenicilina = Penicilina G

R=fenoximetil → fenoximetilpenicilina = Penicilina V

R=n-heptil → n-heptilpenicilina = Penicilina K

R=2-pentenil → 2-pentenilpenicilina = Penicilina F

R=*p*-hidroxibenzil → *p*-hidroxibenzilpenicilina = Penicilina X

R=alilmercaptometil → alilmercaptometilpenicilina = Penicilina O (Fig.30)

Dintre acestea, în industrie se produc numai penicilina G, penicilina V şi în cantități limitate penicilina O.

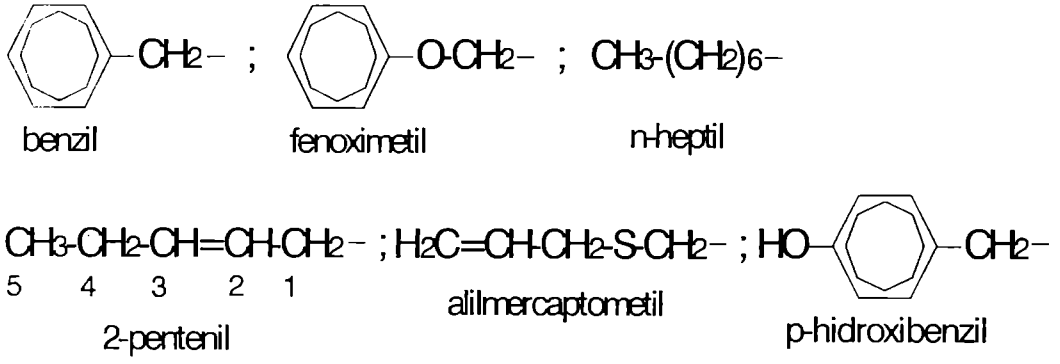


Fig. 30 Diferiți radicali care dau diferitele tipuri de peniciline

3. Producerea industrială a penicilinei

Compoziția mediilor de cultură pentru biosinteza penicilinei cuprinde în mare: glucoză, lactoză, *corn-steep*, KH_2PO_4, $CaCO_3$, ulei vegetal sau animal. Prezența a două

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

zaharuri ca sursă de carbon şi energie este necesară, deoarece, în prima fază, mucegaiul creşte rapid pe seama glucozei. După ce aceasta s-a consumat, creşterea încetează şi producerea penicilinei are loc pe seama lactozei, care este utilizată mai încet. Prezența lactozei favorizează producții crescute de antibiotic şi aceasta se explică prin aceea că mucegaiul utilizează acest zahăr mai încet, fiind vorba de o represie prin catabolit a sintezei enzimelor respective. S-a constatat totuşi, că un adaus menajat de glucoză duce la randamente similare, ceea ce este un avantaj, deoarece glucoza este mult mai ieftină. Valoarea pH optimă pentru producția penicilinei este de 6,8 - 7,8 şi este menținută la această valoare de către $CaCO_3$ şi KH_2PO_4. Uleiurile vegetale sau animale se adaugă ca antispumanți, dar constituie şi o sursă de energie. În afara acestor substanțe, mediul de cultură trebuie să conțină neapărat un precursor, care permite orientarea selectivă a producției, spre un anumit tip de penicilină, furnizând microorganismului elementele catenei laterale. În acest scop, acidul fenilacetic (C_6H_5-CH_2-COOH) este universal utilizat pentru obținerea penicilinei G, iar acidul fenoxiacetic (C_6H_5-O-CH_2-COOH) pentru obținerea penicilinei V. Precursori se folosesc în proporție de 0,01-0,05% față de volumul mediului de cultură.

4. Penicilinele semi-sintetice

Penicilina G prezintă unele dezavantaje, care restrâng utilizările ei:

- Este sensibilă față de penicilinază. Această enzimă, o penicilin-amido-β-lactam-hidrolază, scindează nucleul β-lactam, ducând la formarea acidului peniciloic inactiv. Capacitatea de a forma penicilinază este una din cauzele rezistenței la penicilină şi se datoreşte prezenței la bacteriile respective a plasmidei R;
- Este labilă în mediu acid, deci este distrusă de aciditatea din stomac şi de aceea trebuie injectată;
- Este eliminată repede din circulația sanguină prin rinichi; de aceea, pentru menținerea unei concentrații crescute trebuie injectată zilnic;
- Are acțiune numai asupra bacteriilor Gram-pozitive.

Aceste dezavantaje sunt eliminate de penicilinele semi-sintetice, care sunt stabile în mediu acid, sunt penicilinazo-rezistente şi au o activitate mai mare, unele dintre ele şi asupra bacteriilor Gram-negative. Aceste proprietăți sunt determinate de catena laterală din poziția 6 a acidului 6-amino-penicilanic.

Obținerea penicilinelor semi-sintetice se face jumătate prin biosinteză, jumătate prin sinteză chimică. Astfel, se obține întâi prin biosinteză penicilina G, care, după izolare, este supusă acțiunii unei penicilin-acilaze, izolată din *Escherichia coli*. Aceasta, fiind o penicilin-amido-hidrolază, separă cantitativ catena laterală, obținându-se acidul 6-aminopenicilanic. Se

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

procedează astfel, deoarece obținerea directă, pe cale microbiologică a acidului 6-amino-penicilanic este grea. Prin sinteză chimică, funcția aminică a acestuia poate fi ușor acilată, obținându-se penicilinele semi-sintetice. Cele mai importante peniciline semi-sintetice sunt: **ampicilina, oxacilina, meticilina** (Fig.31).

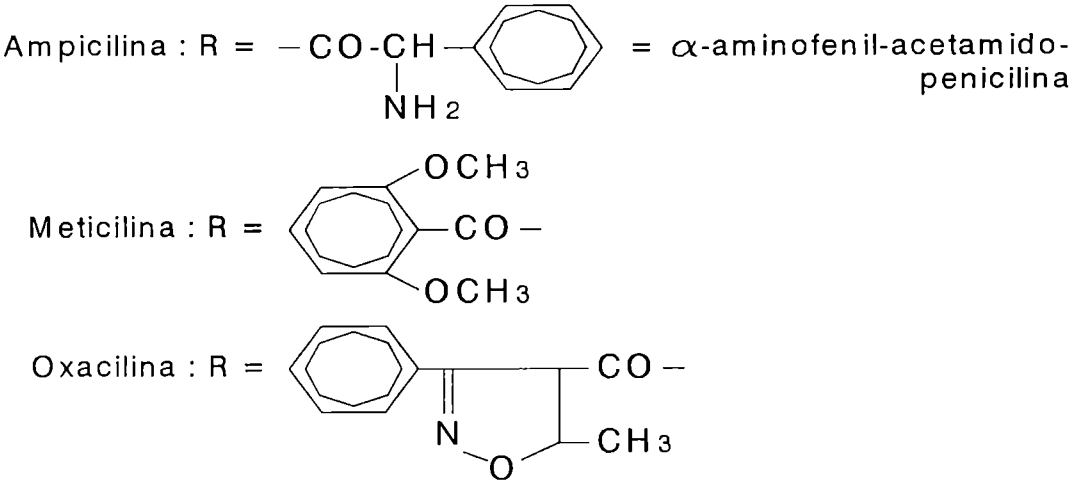


Fig. 31 Diferiți radicali care dau diferitele tipuri de peniciline semi-sintetice

5.2. Streptomicina

A fost descoperită de Waksman în 1944 într-o cultură de *Streptomyces griseus*. Interesul primordial pe care-l reprezintă acest antibiotic este activitatea sa contra agentului patogen al tuberculozei *Mycobacterium tuberculosis*. În afară de această acțiune particulară, streptomicina și antibioticele înrudite cu ea: kanamicina, neomicina și gentamicina sunt active contra numeroși germeni Gram-negativi.

1 Structură

Streptomicina este un glicozid format din două zaharuri rar întâlnite: *L-streptoza* (un zahăr metilat) și *N-metil-L-glucozamină* și un aglicon: *streptidina*. Agliconul, streptidina, se leagă printr-o legătură α-glicozidică de L-streptoză și aceasta, la rândul ei, formează o legătură α-glicozidică cu N-metil-L-glucozamina.

2. Producerea industrială

Se folosesc tulpini selecționate de *Streptomyces griseus* care formează până la 10g/l streptomicină în 6 zile. Condițiile optime de producere sunt:

- O concentrație adecvată, dar nu excesivă de glucoză. Glucoza reprezintă sursa de carbon principală, deși se pot folosi cu rezultate satisfăcătoare și alte zaharuri ca: fructoză,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

galactoză, lactoză, maltoză, amidon. Este important de menționat că producătorii de streptomicină sunt incapabili de a folosi zaharoza;

- O sursă de azot anorganică, sub formă de săruri de amoniu sau nitrați este de preferat, pentru un control mai uşor al valorii pH. Cantitatea de sursă de azot trebuie să fie şi ea limitată, pentru a evita formarea unei cantități excesive de miceliu, ceea ce ar duce la o scădere de radament;

- O concentrație scăzută de fosfat anorganic, deoarece fosfatul inhibă sinteza streptomicinei. Valoarea optimă este de: 0,006-0,02%g/v;

- Menținerea valorii pH între 7,8-8,00;

- Menținerea temperaturii între 27^0-29^0C;

- O bună aerare.

În cursul procesului de producere a streptomicinei şi anume, în primul stadiu, se formează alături de streptomicină o substanță: *manozidostreptomicină,* sau *streptomicină B*, care posedă un rest de D-manoză, legat printr-o legătură α-glicozidică de C_4 al N-metil-L-glucozaminei. Manozidostreptomicina este mult mai puțin activă decât streptomicina, astfel încât, procesul se dirijează pentru a transforma manozidostreptomicina în streptomicină. Acest lucru are loc spre sfârşitul procesului, sub acțiunea unei enzime, *manozidaza*, care scindează manozidostreptomicina în streptomicină şi manoză. Această enzimă este reglată prin represia prin catabolit a sintezei enzimelor şi de aceea, ea se formează numai când glucoza s-a consumat, ceea ce se întâmplă spre sfârşitul procesului de producție a streptomicinei. Manozidaza este o enzimă indusă, formarea ei fiind indusă de manoză, substanță care se găseşte în mananul de drojdie (*yeast manan*) constituent al reziduurilor de la distilarea alcoolului (*distiller's solubles*), care se adaugă în mediul de producție a streptomicinei. Factorii de mediu care influențează activitatea enzimei sunt:

- metalele grele şi aerarea insuficientă inhibă activitatea enzimei;

- o cantitate de glucoză mai mare de 0,5-1,0% în mediu, inhibă complet activitatea enzimei;

- pH=8,0;

- temperatura de 32^0C.

Condițiile optime pentru activitatea enzimei pot fi realizate numai spre sfârşitul perioadei de producție, când biosinteza streptomicinei a fost terminată, deoarece, unele din aceste condiții, în special cele privitoare la pH şi temperatură sunt nefavorabile pentru biosinteza streptomicinei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O altă problemă care se pune în cursul procesului de producție a streptomicinei este că tulpinile de *Streptomyces griseus* sunt sensibile la fagi, iar contaminările cu fagi se produc cu toate condițiile riguroase de sterilizare.

Totuşi, folosirea tulpinilor rezistente la fagi şi utilizarea agenților care complexează calciul, cum sunt citrații sau oxalații, reduc considerabil acest risc.

3. Derivați de streptomicină

- *Dihidrostreptomicina* a înlocuit streptomicina în majoritatea aplicațiilor medicale, datorită faptului că este mai puțin toxică. Se obține prin hidrogenarea catalitică a streptomicinei, în cursul căreia, funcția aldehidică a moleculei de streptoză se transformă în funcție de alcool primar. În 1960, s-au izolat tulpini de *Streptomyces* capabile să producă direct, prin biosinteză, dihidrostreptomicină.
- *Hidroxistreptomicina* se obține prin oxidarea grupării metilice a streptozei şi are proprietăți similare cu ale streptomicinei. A fost obținută şi prin biosinteză cu *Streptomyces griseocarnus.*

Totuşi, datorită efectelor secundare pe care le produce şi a rezistenței bacteriene, care se instalează rapid, în prezent, atât streptomicina, cât şi derivații săi au fost înlocuiți în tratamentul tuberculozei cu alte substanțe obținute prin sinteză chimică. De asemenea, în infecțiile cu bacterii Gram-negative sunt preferate penicilinele de semi-sinteză şi tetraciclinele.

5.3. Tetraciclinele

Tetraciclinele constituie actualmente cel mai important grup de antibiotice, datorită spectrului antibacterian foarte larg şi toxicității lor slabe. Aceasta permite utilizarea lor pe cale orală în tratamentul afecțiunilor cauzate de: bacterii Gram-pozitive şi Gram-negative, inclusiv mycoplasme, rickettsii ca şi protozoare (amoebe) şi unele virusuri mari. Sunt produse de bacterii din genul *Streptomyces.*

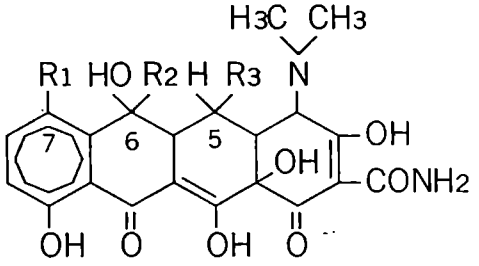
1. Structură şi proprietăți fizico-chimice

Din punct de vedere chimic, tetraciclinele sunt caracterizate prin prezența unui schelet comun: *octahidronaftacenic*, substituit în pozițiile 5, 6, 7 cu diferiți radicali, care dau diferitele tipuri de tetracicline (Fig.32).

Clortetraciclina şi oxitetraciclina sunt instabile în mediu puternic acid şi sunt în special instabile la valori de pH peste 7,0.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tetraciclina este mai stabilă la pH alcalin decât primele două, iar demeclociclina este cea mai stabilă dintre toate.



R1	R2	R3	
H	CH_3	H	= Tetraciclina
H	CH_3	OH	= Oxitetraciclina
Cl	CH_3	H	= Clortetraciclina
Cl	H	H	= Demeclociclina (Demetilclortetraciclina)

Fig. 32 Tipuri de tetracicline

2. Descrierea membrilor grupului

Primul antibiotic izolat din această grupă a fost *clortetraciclina*, numită şi *aureomicină*, în 1948, dintr-o cultură de *Streptomyces aureofaciens*. La producția clortetraciclinei un exces de fier este dăunător, deoarece scade randamentul. Se utilizează de aceea bioreactoare din aluminiu sau oțel inoxidabil. Aerarea şi agitarea joacă de asemenea rol important.

Oxitetraciclina, numită şi *teramicină* a fost al doilea antibiotic din această grupă, izolat în 1950, dintr-o cultură de *Streptomyces rimosus.*

Tetraciclina, deşi pare paradoxal, a fost izolată câțiva ani mai târziu, în 1953, cu o cultură de *Streptomyces aureofaciens*, în condiții speciale de cultivare. Într-adevăr, diferitele specii de *Streptomyces* pot produce diferitele tipuri de tetracicline şi numai prin controlul condițiilor de cultivare şi în special al compoziției mediului se poate orienta biosinteza spre tetraciclină. Factorul cel mai important este concentrația ionului clor din mediu, care nu trebuie să depăşească 17p.p.m. Îndepărtarea excesului de clor din mediu se face cu răşini schimbătoare de ioni sau prin precipitare sub formă de AgCl sau Hg_2Cl_2.

Demeclociclina caracterizată prin absența grupării metil din poziția 6 a fost obținută cu anumite mutante de *Streptomyces aureofaciens* prezentând defect în ceea ce priveşte metilarea în poziția 6. Prezintă unele avantaje medicale: activitate asupra germenilor rezistenți la tetraciclină sau acțiune prelungită. Este punctul de plecare pentru tetraciclinele semi-sintetice: *meticilina, minocilina.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

6. Reglarea biosintezei antibioticelor

Genele conținând informația genetică pentru sinteza antibioticelor sunt atât cromosomale, cât şi extracromosomale. Într-un singur caz, genele structurale pentru sinteza antibioticelor sunt localizate în plasmide. În mod frecvent, genele structurale sunt cromosomale, în timp ce genele reglatoare, care controlează expresia acestor gene sunt extracromosomale. Mecanismele de reglare a sintezei antibioticelor sunt cele cunoscute şi anume: inhibiția *feed-back* a activității enzimelor, inducția şi represia sintezei enzimelor şi represia prin catabolit a sintezei enzimelor.

Inhibiția feed-back a activității enzimelor se manifestă în mai multe feluri. Cel mai simplu este cazul când un antibiotic format în exces inhibă prin *feed-back* propria lui formare, ca de exemplu, cloramfenicolul. A doua modalitate este aceea în care, un produs final al metabolismului primar este un precursor al unui metabolit secundar, respectiv al unui antibiotic. În acest caz, eliminarea reglării prin *feed-back* în calea metabolică primară, duce la creşterea producției metabolitului secundar, adică a antibioticului. De exemplu, se ştie că valina, care este un metabolit primar, intră în structura penicilinei, respectiv a nucleului comun, acidul 6-amino-penicilanic. S-a constatat, că dacă se elimină (prin mutație) inhibiția *feed-back* manifestată de valină asupra activității primei enzime din lanțul anabolic, acid acetohidroxisintetaza, se măreşte implicit producția de penicilină.

A treia modalitate de reglare prin *feed-back* se datorează faptului că unele căi de biosinteză a antibioticelor sunt ramificate, ele având o cale comună, până la un intermediar, de unde începe ramificarea către sinteza metabolitului primar pe de o parte şi a metabolitului secundar, pe de altă parte. Deci, căile de sinteză a metaboliților secundari interferă prin aceşti intermediari comuni cu căile de biosinteză a metaboliților primari (Tabelul 8).

În asemenea cazuri inhibiția *feed-back* a activității primei enzime din calea comună de biosinteză exercitată de metabolitul primar final duce la diminuarea producției metabolitului secundar. Cel mai tipic exemplu este inhibiția produsă de lizină asupra producerii de penicilină de către *Penicillium chrysogenum*. La acest mucegai, spre deosebire de bacterii, calea de biosinteză a lizinei este prin acid α-aminoadipic, care este în acelaşi timp şi intermediar în biosinteza penicilinei, intrând în structura nucleului comun, acidul 6-amino-penicilanic. S-a constatat că lizina inhibă activitatea primei enzime din calea comună de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

sinteză şi anume homocitratsintetaza, care duce la formarea acidului α-aminoadipic şi în felul acesta se inhibă şi producerea de penicilină.

Tabel 8. Interferența căilor de biosinteză a metaboliților primari şi secundari

Intermediar	Metabolit primar final	Metabolit secundar final
Acid chorismic	Triptofan	Cloramfenicol Nistatină
Acid α-amidoadipic	Lizină	Peniciline Cefalosporine
Malonil-CoA	Acizi graşi	Griseofulvină Tetracicline Patulină Cicloheximidă

Inducția sintezei enzimelor acționează ca mecanism de reglare în biosinteza unor antibiotice ca cefalosporina C şi streptomicina. Pentru cefalosporina C metionina acționează atât ca precursor, cât şi ca inductor al biosintezei acestui antibiotic. În cazul streptomicinei, s-a evidențiat prezența unei substanțe, numită factor A (2-S-izocapriloil-3-R-hidroximetil-γ-butirolactonă), funcționând ca inductor în biosinteza streptomicinei (induce sinteza enzimelor cheie implicate în biosinteza streptomicinei). Factorul A nu este înrudit chimic cu streptomicina şi nici nu este un precursor al acesteia (Fig.33). În timpul trofofazei, factorul A este sintetizat şi secretat în mediu. Când concentrația lui atinge nivelul critic, factorul A induce sinteza enzimelor cheie implicate în biosinteza streptomicinei. Că lucrurile stau astfel o dovedeşte faptul că mutante factor A^- şi-au pierdut capacitatea de sinteză a streptomocinei, dar dacă se adaugă în mediu factor A sintetic, mutantele respective pot sintetiza streptomicină. Mecanismul molecular al inducției exercitată de factorul A nu este bine cunoscut, dar o serie de date arată că el intervine la nivelul metabolismului glucidic şi anume, inhibă activitatea NADP-glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, enzimă care inițiază ciclul HMP (ciclul pentozofosfat) cu formare de 6-fosfogluconat. Se pare că factorul A nu acționează direct asupra acestei enzime, ci induce formarea unui compus care inhibă activitatea glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei. Acest compus ar putea fi adenozindifosforiboza, un produs de degradare al NADP sub acțiunea NAD-fosfatazei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

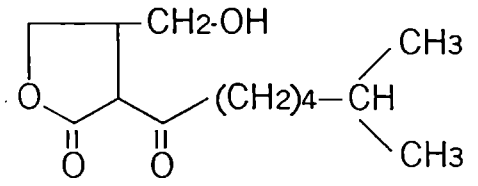


Fig. 33 Structura chimică a factorului A de la *Streptomyces gryseus*

Acestă ipoteză se bazează pe faptul că dacă ciclul pentozofosfat este blocat la nivelul glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, glucoza este transformată preferențial în unitățile de structură ale streptomicinei (streptoză, streptidină şi N-metil-L-glucozamină) în loc să fie oxidată (fig.34).

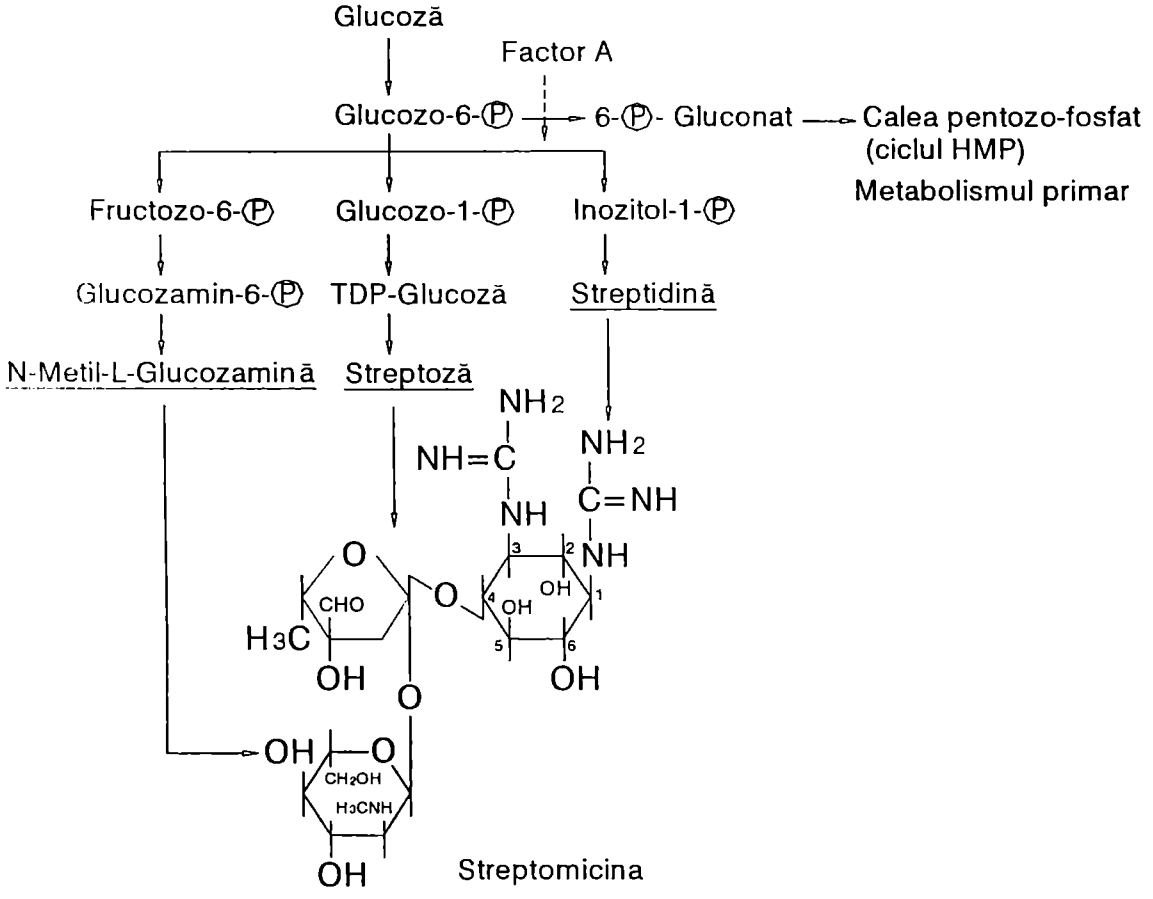


Fig. 34 Mecanismul factorului A
Legenda: TDP=Timidindifosfat

Represia sintezei enzimelor este ilustrată în cazul biosintezei streptomicinei, care este inhibată puternic de către fosfatul din mediu. De aceea, la producerea industrială a streptomicinei concentrația de fosfat trebuie să fie suboptimă, adică, 0,006-0,02% g/v.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Biosinteza streptomicinei include cel puțin trei etape de clivare prin fosfat, implicate în formarea streptidinei. Penultimul compus în această biosinteză este streptomicin-fosfatul, în care, fosfatul esterifică gruparea hidroxil în poziția 6 a streptidinei şi care, sub acțiunea streptomicin-fosfatazei se desface în streptomicină şi fosfat. Dacă biosinteza streptomicinei are loc într-un mediu cu adaus de 10mM fosfat, producția de streptomicină descreşte, iar în mediu se acumulează streptomicin-fosfat, din cauza represiei enzimei streptomicin-fosfataza de către fosfat.

Represia prin catabolit a sintezei enzimelor poate fi evidențiată în cazul biosintezei penicilinei şi streptomicinei. Se cunoaşte de mult faptul că glucoza afectează negativ producția de penicilină de către *Penicillium chrysogenum*, motiv pentru care, în industria penicilinei se foloseşte lactoza la producerea acestui antibiotic. Nu de mult însă, s-a descoperit că dacă glucoza se adaugă în mod continuu, în mici cantități, producția de penicilină nu este afectată. Studii recente au arătat că glucoza produce represia enzimelor implicate în încorporarea valinei în nucleul de bază al penicilinei, acidul 6-amino-penicilanic.

La biosinteza streptomicinei sursa de carbon şi energie din mediu este glucoza.

În primul stadiu al biosintezei, alături de streptomicină se formează şi manozidostreptomicină, o substanță mai puțin activă decât streptomicina. Manozidostreptomicina este scindată în streptomicină şi manoză sub acțiunea enzimei manozidaza. Această enzimă este reglată prin represia prin catabolit a sintezei enzimelor şi de aceea, se formează numai când glucoza s-a consumat din mediu, ceea ce se întâmplă spre sfârşitul procesului de producție al streptomicinei.

Un tip special de reglare este cel *prin încărcarea energetică a celulei*, care implică activarea şi inhibarea enzimelor metabolismului primar de către nivelurile relative ale ATP, ADP şi AMP în celulă. Încărcarea energetică a celulei este măsurată cantitativ de ecuația:

$$\frac{2[ATP]+1/2[ADP]}{[ATP]+[ADP]+[AMP]}$$

O încărcare energetică mare a celulei inhibă unele enzime şi activează altele. O concentrație mare de fosfat în mediu poate creşte formarea de ATP şi duce la încărcarea energetică mare a celulei.

Acest tip de reglare a fost observat la biosinteza clortetraciclinei, care este redusă în mod marcat de fosfatul anorganic din mediu; în condiții de cultivare discontinuă, idiofaza începe când fosfatul din mediu s-a epuizat. Cum biosinteza clortetraciclinei nu implică niciunul din intermediarii fosforilați cunoscuți, efectul dăunător al fosfatului nu se poate explica prin reglarea prin fosfataze ca în cazul streptomicinei, ci prin încărcarea energetică a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

celulei. Pentru a dovedi acest lucru, o serie de cercetători au examinat concentrația de ATP a două tulpini de *Streptomyces aureofaciens:* o tulpină înalt producătoare de antibiotic şi una slab producătoare. La ambele tulpini, concentrația de ATP creşte rapid în timpul creşterii, apoi descreşte rapid şi rămâne la un nivel scăzut pe timpul procesului de biosinteză a antibioticului. S-a constatat însă, că tulpina slab producătoare conține de 2-4 ori mai mult ATP, decât tulpina înalt producătoare, fapt care confirmă rolul ATP, deci al încărcării energetice celulare în reglarea biosintezei antibioticului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL VI

ENZIME

Folosirea enzimelor în diverse industrii se bazează pe o serie de avantaje pe care acestea le prezintă, comparativ cu reactivii chimici şi anume:

- sunt netoxice, ceea ce este foarte important pentru industria alimentară;
- datorită specificităţii de acţiune, acţionează numai asupra substratului, fără a cauza schimbări chimice nedorite;
- enzimele acţionează eficient în condiţii de temperatură moderată şi de pH neutru;
- fiind catalizatori organici, enzimele acţionează rapid în concentraţie mică şi acţiunea lor poate fi oprită la stadiul dorit, prin inactivarea enzimei.

La început, preparatele enzimatice folosite au fost numai cele de origine vegetală şi animală. Folosirea cheagului sau a malţului de exemplu, este cunoscută de mai multe secole.

În 1897, Buchner a izolat prima enzimă provenind dintr-un microorganism, **zimaza** din drojdie. Ulterior s-a constatat că zimaza este de fapt un complex de enzime, dar această descoperire a deschis calea utilizării preparatelor enzimatice microbiene în diverse domenii.

Folosirea preparatelor enzimatice microbiene, s-a dovedit chiar mai avantajoasă decât a celor de origine vegetală sau animală, din următoarele motive:

- microorganismele se cultivă uşor pe medii de cultură ieftine; în acest fel, cantitatea de preparate enzimatice nu este limitată de lipsa materiei prime, iar preţul de cost la care se pot obţine, le face competitive cu produsele similare din alte surse;
- un mare număr de enzime poate fi obţinut, pe cale economică de la microorganisme;
- microorganismele elaborează enzime extracelulare de tipul hidrolazelor, care sunt eliberate în mediu, de unde se pot separa cu uşurinţă. Aceasta constituie unul din motivele cele mai importante pentru care, preparatele enzimatice microbiene sunt preferate altor preparate.

Primele cercetări privind obţinerea industrială a enzimelor microbiene au fost făcute de Takamine în 1914, cu preparate amilolitice fungice şi de Boidin şi. Effront în 1917, cu preparate amilolitice bacteriene. De atunci, interesul pentru întrebuinţarea în industrie a enzimelor microbiene a crescut în mod constant. Preparatele enzimatice microbiene îşi găsesc aplicaţii în diferite industrii alimentare, îndustria textilă, industria pielăriei, în medicină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Ca urmare, acest domeniu al microbiologiei industriale este de mare viitor, el intrând în competiție cu industria chimică de sinteză.

Principalele preparate enzimatice microbiene produse la ora actuală pe plan mondial sunt:

- Proteaza bacteriană ..... 500 tone/an;
- Proteaza fungică..... 10 tone/an;
- Renina microbiană..... 10 tone/an;
- Amilaza bacteriană..... 300 tone/an;
- Glucoamilaza fungică ..... 300 tone/an;
- Amilaza fungică ..... 10 tone/an;
- Glucoizomeraza fungică ..... 50 tone/an;
- Pectinaze fungice ..... 10 tone/an.

1. Microorganisme folosite pentru producerea de enzime

Pentru ca un microorganism să fie folosit pentru obținerea pe scară industrială de enzime, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să producă enzima sau sistemul enzimatic dorit în cantitate cât mai mare;
- să aibă o mare stabilitate în producție. Din acest punct de vedere, se preferă tulpini cu activitate enzimatică ceva mai mică, dar care dau cantități constante de enzimă în producție, în locul tulpinilor găsite înalt productive în laborator, dar care, trecute în producție dau fluctuații de randament;
- să nu fie patogen;
- să nu producă substanțe toxice;
- să nu posede activitate antibiotică sau potențial alergen;
- să se dezvolte pe medii de cultură ieftine;
- procesul de dezvoltare a microorganismului şi de biosinteză a enzimelor să dureze cât mai puțin;
- separarea biomasei de faza lichidă, după terminarea procesului, să se efectueze cât mai simplu.

Microorganismele folosite pentru obținerea industrială a enzimelor aparțin bacteriilor şi fungilor microscopici (drojdii şi mucegaiuri). Dintre bacterii, se folosesc specii ale genului *Bacillus* şi *Streptomyces*. Dintre drojdii, *Saccharomyces cerevisiae* şi *S. carlsbergensis* se

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

folosesc pentru obținerea de invertază, iar *S. fragilis* pentru obținerea de lactază. Dintre mucegaiuri, cele mai utilizate sunt speciile genurilor *Aspergillus, Penicilium, Mucor* şi *Rhizopus*. Capacitatea de producere a diverselor enzime de către microorganisme este determinată genetic. Cunoaşterea mecanismelor de reglare a sintezei enzimelor dorite, permite obținerea unei producții crescute a acestora, prin adăugarea unor inductori şi îndepărtarea represorilor din mediul de cultură a microorganismului utilizat.

Prin mutație, sub acțiunea unor agenți fizici sau chimici, se poate obține ameliorarea caracterelor existente sau apariția unor însuşiri convenabile, care nu se găsesc în stare naturală.

Se pot obține astfel, mutante la care a fost anulată inducția sintezei enzimelor, deci la care, nevoia de inductor a fost suprimată, ceea ce este important, mai ales dacă inductorul este scump. De asemenea, se pot obține mutante la care a fost anulată represia sintezei enzimelor, deci la care, biosinteza unei enzime nu este reprimată de produsul final al biosintezei, sau mutante rezistente la represia prin catabolit a sintezei enzimelor, deci la care sinteza enzimelor nu este reprimată de glucoză.

Altă modalitate de ameliorare a caracterelor unei tulpini microbiene sub raportul producerii de enzime este ingineria genetică, adică inserarea în genomul bacteriei respective a unei gene provenind de la alt organism, bacterie sau organism eucariot, care să-i confere acestuia proprietăți noi.

Totuşi, genetica microorganismelor utilizate în producția industrială de enzime este încă puțin cunoscută, motiv pentru care, mutageneza este încă metoda cea mai larg utilizată.

Spre deosebire de capacitatea de producere a enzimelor de către un microorganism, care este determinată genetic, tipul de enzimă şi cantitatea sa sunt considerabil influențate de condițiile de mediu: compoziția mediului de cultură, pH, temperatură, aerare şi agitare. În ceea ce priveşte compoziția mediului de cultură au importanță sursa de carbon, sursa de azot, factorii de creştere şi urmele de metale. Sursa de carbon este reprezentată de glucide, care pot servi şi ca sursă de energie sau ca inductori ai sintezei enzimatice ca de exemplu: amidonul pentru formarea amilazei, maltoză pentru maltază şi în unele cazuri pentru amilază, xilanul pentru xilanază, etc. În mod similar, peptidele şi aminoacizii din hidrolizatele proteice folosite ca sursă de azot pot servi ca inductori pentru sinteza proteazelor. Factorii de creştere, reprezentați de diferite extracte complexe adăugate în mediu ca: extract de drojdie, *corn-steep, distiller's solubles* contribuie la sintetizarea grupului prostetic al enzimei.

Dintre metale, Ca^{2+} este esențial pentru activitatea şi stabilitatea multor enzime extracelulare ca de exemplu, α-amilazele bacteriene şi fungice şi proteinazele bacteriene şi

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

fungice. Zn^{2+} este necesar pentru formarea dimerului de α–amilază de la *Bacillus subtilis*, care nu poate cristaliza în formă de monomer, deşi monomerul este enzimatic activ. Mg^{2+} este esențial pentru formarea dextransucrazei de la *Leuconostoc mesenteroides*. Într-un mediu deficient de Mg^{2+}, bacteria sintetizează un dextran relativ linear, format din 40 – 50 de resturi de glucoză, în timp ce enzima normală sintetizează un dextran ramificat, în care lanțurile sunt formate numai din 6-7 resturi de glucoză, punctele de ramificație fiind legăturile α-1-3 şi necesită Mg^{2+} pentru formarea sa.

În ceea ce priveşte indicele pH, trebuie spus că majoritatea enzimelor extracelulare microbiene sunt produse în cantitate mare la valoarea pH de creştere a microorganismului respectiv, care este foarte apropiat de cea optimă pentru activitatea maximă a enzimei. Există însă şi multe cazuri în care, valoarea pH de creştere pentru obținerea unei cantități maxime de enzimă, este foarte diferită de valoarea optimă de activitate a enzimei. Cel mai tipic exemplu în acest sens este subtilizina, proteaza produsă de *Bacillus subtilis*, care se formează cel mai bine la pH= 6,5 – 6,8, dar optimul de activitate a enzimei este la pH=11,0.

Astfel de diferențe se observă şi în ceea ce priveşte influența temperaturii, în sensul că formarea enzimelor în cantitate maximă are loc la temperaturi mai joase decât temperatura de crestere a microorganismului. Lucrul acesta este valabil pentru celulaze, proteaze fungice şi bacteriene, dextransucrază.

În ceea ce priveşte influența aerării şi agitării, aceasta variază cu microorganismul folosit şi cu enzima produsă. De exemplu, o aerare şi agitare energică sunt necesare pentru producerea α–amilazei de către *A. niger*, a invertazei de către drojdii şi a subtilizinei de către *Bacillus subtilis*. În alte cazuri, o aerare şi o agitare puternică influențează nefavorabil producerea de enzimă. Este cazul α–amilazei produsă de *Bacillus subtilis*, unde, cantitatea de enzimă este mult diminuată, dacă pelicula de la suprafața mediului de cultură este ruptă prin agitare.

2. Producerea industrială a enzimelor microbiene.

Producerea industrială a enzimelor microbiene presupune următoarele etape: selectarea microorgasnismelor bune producătoare de enzime, stabilirea condițiilor optime pentru obținerea enzimei, producerea industrială propriu-zisă şi, separarea şi purificarea din mediul de cultură.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.1 Selectarea microorganismelor bune producătoare de enzime.

Selectarea se face în laborator, prin aşa numitele tehnici de *screening*, care urmăresc fie găsirea de microorganisme producătoare de noi enzime, fie găsirea de noi tulpini cu potenţial ridicat de producţie a unei enzime cunoscute. Aceste tehnici pornesc de la culturi de colecţie sau de la culturi nou izolate, din surse naturale bogate în substratul asupra căruia vrem să acţioneze enzima şi constau în următoarele:

- cultivarea în plăci Petri, pe mediu solidificat cu agar, conţinând substratul enzimei respective. Pe un astfel de mediu, selectarea coloniilor bune producătoare de enzime se face dupa mărimea zonei de acţiune asupra substratului;
- cultivarea pe mediu lichid a tulpinilor selectate, cu scopul determinării cantitative a activităţii enzimatice şi a selectării pe această bază a celor cu activitatea cea mai mare a enzimei dorite.

2.2. Stabilirea condiţiilor optime pentru obţinerea enzimei dorite se face întâi în laborator şi apoi în staţia pilot şi se referă la compoziţia mediului de cultură, pH, temperatură, aerare şi agitare. Aceşti parametri se studiază şi în staţia pilot pentru stabilirea condiţiilor de obţinere a enzimei la nivel industrial. Tot în staţia pilot se studiază şi procedeele de separare din mediul de cultură.

2.3. Producerea industrială propriu-zisă se face după două procedee de cultivare: în suprafaţă şi submersă. Înainte de cel de-al doilea război mondial enzimele microbiene se obţineau numai prin metoda de cultivare în suprafaţă pe medii solide sau semisolide. În prezent însă, cultivarea submersă pe medii lichide este folosită din ce în ce mai mult. De exemplu, cultivarea submersă a suplinit complet procesul de cultivare în suprafaţă în cazul enzimelor bacteriene produse de *Bacillus subtilis*. Totuşi, unele enzime fungice continuă să fie produse în suprafaţă, după procedeul original al lui Takamine.

Fiecare din cele doua metode de cultivare prezintă şi avantaje şi dezavantaje. Cultivarea în suprafaţă prezintă avantajul simplităţii operaţiilor, necesităţilor reduse de energie şi absenţei problemelor de contaminare; prezintă în schimb dezavantajul că necesită spaţii mari şi multa forţă de muncă. Cultivarea submersă prezintă avantajul economiei de spaţiu şi forţă de muncă şi uniformităţii proceselor, care se pretează automatizării şi uşurinţei controlului; prezintă în schimb dezavantajul unui consum mare de energie şi ocazional, probleme serioase de contaminare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

1. Cultivarea în suprafață pentru producerea enzimelor. Procedeul a fost imaginat de Takamine pentru obținerea α–amilazei (takadiastază) din *Aspergillus oryzae* şi se mai foloseşte şi în prezent pentru obținerea unor enzime fungice ca: proteaza din *Aspergillus oryzae*, glucamilaza din *Rhizopus sp.*, celulazele din *Trichoderma viridae* şi *Aspergillus niger*, enzima de coagulare a laptelui din *Mucor pusillus*. Metoda a fost dezvoltată de Takamine pentru producerea pe scară industrială a α–amilazei fungice, atât în S.U.A, cât şi în Japonia. Procedeele utilizate astăzi sunt numai puțin modificate față de procedeul original al lui Takamine.

În acest procedeu, mucegaiul este cultivat în suprafață pe un substrat solid, în tăvi, în camere mari sau în tambure rotative orizontale. Camerele, tăvile sau tamburele sunt spălate cu detergent, dezinfectate cu NaOCl, formaldehidă sau săruri de amoniu cuaternar şi apoi în curent de vapori de apă de câteva ori.

Substratul de bază, tărâțele de grâu, uneori şi tărâțele de orez, şrotul de diferite cereale se amestecă cu apă, la care se adaugă alte substanțe nutritive, acizi sau substanțe tampon şi se sterilizează în vapori sub presiune. Plămada este apoi răcită şi însămânțată cu spori de mucegai, obținuți în laborator, tot pe mediu cu tărâțe. Plămada însămânțată este apoi întinsă în strat subțire în tăvi sau în tambure rotative şi lăsată la incubat în camerele pregătite în acest scop. Temperatura şi umiditatea sunt controlate prin circulația aerului rece şi umed deasupra plămezii. Procesul se opreşte când cantitatea de enzimă a atins maximul, ceea ce variază între 1 şi 7 zile, în funcție de microorganismul folosit. Procedeul se mai numeşte şi *koji*, deoarece aşa se numesc tărâțele însămânțate cu mucegai. Extragerea enzimei se face cu apă sau tampon, urmată de filtrare.

2. Cultivarea submersă pentru producerea enzimelor. Acest procedeu este folosit în prezent pentru obținerea multor enzime microbiene printre care: amilaze şi proteaze bacteriene, glucamilaze, pectinaze, celulaze, hemicelulaze, lipaze, lactaze, glucooxidaza, catalaza, toate de origine fungică. În acest caz, cultivarea se face într-un mediu lichid adecvat, aflat în bioreactoare închise, prevăzute cu agitatoare, dispozitive pentru aerare şi controlul temperaturii şi a valorii pH. Procesul durează între 1 – 5 zile, în funcție de microorganismul folosit şi de enzima produsă.

2.4 Separarea enzimelor presupune următoarele etape:

1. Extracția: dacă enzimele sunt extracelulare, se face întâi o separare de corpii microbieni şi de părțile insolubile ale mediului, prin centrifugare sau filtrare. Lichidul

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

obținut este apoi clarificat. Dacă enzimele sunt intracelulare, se recoltează masa microbiană prin centrifugare sau filtrare, după care celulele vii sunt dezintegrate prin mijloace fizice (ultrasunete, de exemplu) sau prin autoliză. Resturile celulare se separă prin centrifugare, iar supernatantul, care conține enzimele este clarificat.

2. Concentrarea: soluțiile enzimatice clarificate sunt concentrate prin evaporare în vid, la temperaturi scăzute, operație care trebuie să fie rapidă și care necesită stabilizarea enzimei cu substanțe protectoare. Deoarece evaporarea în vacuum nu poate fi utilizată decât în unități industriale mari, datorită cheltuielilor ridicate de investiție și de întreținere, se preferă și se practică (cu succes) procedeul de concentrare și purificare prin ultrafiltrare. Ultrafiltrarea reprezintă procesul de separare a componentelor unei soluții, datorită diferențelor de volum molecular, cu ajutorul unei membrane. Ultrafiltrarea este un procedeu ideal de separare și purificare a substanțelor biologic active, întrucât:

- permite efectuarea concentrărilor la temperaturi scăzute, micșorând fenomenele de autodigerare și pierderile de activitate prin denaturare termică;
- nu necesită modificări de fază (evaporări, condensări);
- nu utilizează substanțe chimice;
- permite purificarea substanțelor biologic active, prin îndepărtarea unor componente cu volum molecular inferior;
- tăria ionică și valoarea pH a soluției care se concentrează rămân practic constante în timpul prelucrării.

Soluția concentrată de enzimă stabilizată este gata de comercializare sau suportă următoarea etapă.

3. Precipitarea: enzimele fiind proteine, pot fi precipitate prin saturare salină sau cu solvenți organici: acetonă, alcool metilic, alcool etilic și separate prin filtrare sau centrifugare;

4. Uscarea – măcinarea – omogenizarea: produsul filtrat sau centrifugat este uscat în vid, la temperatură scăzută, măcinat și suplimentat cu suporturi cu rol de standardizare și protecție. Aceste suporturi pot fi: glucoză, lactoză, zaharoză, amidon, făinuri, gelatină, cazeină, săruri minerale.

3. Principalele preparate enzimatice microbiene și aplicațiile lor practice.

Principalele preparate enzimatice microbiene aparțin următoarelor grupe:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Hidrolaze: - Glicozidaze: - Oligozidaze
- Poliozidaze
- Proteaze
- Amidaze

Oxidoreductaze: - Glucozoxidaza
- Catalaza

Izomeraze - Glucozoizomeraza.

3.1 Hidrolaze

1. Glicozidaze. Sunt enzime care catalizează hidroliza legăturii glicozidice din oligo- şi polizaharide şi din diferiţi glicozizi. După natura substratului atacat se clasifică în **oligozidaze**, care catalizează hidroliza oligozaharidelor şi glicozizilor şi **poliozidaze**, care catalizează hidroliza polizaharidelor: amidon, celuloză, substanţe pectice.

1. Oligozidaze. Cea mai importantă este **β–fructozidaza** sau **invertaza**, care catalizează hidroliza zaharozei în glucoză şi fructoză. Este o β–fructozidază, deoarece desface molecula de zaharoză din partea moleculei de fructoză, scindând legătura β–fructozidazică. Invertaza trebuie deosebită de α–glucozidază (sau maltază), care scindează pe lângă maltoză şi zaharoza, însă scindează legătura α–glicozidică, aflată de partea moleculei de glucoză.

Invertaza este produsă în special de drojdii: *Saccharomyces cerevisiae* şi *S. carlsbergensis*. Producerea enzimei este puternic stimulată de prezenţa zaharozei în mediu şi de o aerare intensă. Biosinteza invertazei este reglată prin represie prin catabolit, astfel că, viteza de formare a enzimei descreşte apreciabil în prezenţa glucozei din mediu şi creşte ca urmare a epuizării acesteia.

Invertaza este considerată o enzimă intracelulară, deşi marea ei majoritate (91 – 95%) se află sub formă solubilă între membrana plasmatică şi peretele celular şi numai o mică parte (4 – 8%) este legată de membranele interne şi de membrana plasmatică

Invertaza poate fi obţinută prin ruperea peretelui celular sau prin autoliză naturală sau artificială, cu solvenţi organici: toluen, cloroform. Din punct de vedere chimic este o glicoproteină, conţinând 50% manan şi 3% glucozamină, cu o greutate moleculară de 270.000 daltoni; indicele pH optimn de activitate este de 4,0 – 5,5.

Procesul tehnologic de fabricare a preparatelor de invertază din drojdie cuprinde următoarele faze: îmbogăţirea biomasei de drojdie în invertază; autoliza celulelor de drojdie;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

precipitarea enzimei din autolizat; uscarea şi ambalarea produsului. Preparatele comerciale de invertază sunt stabilizate prin adaus de: glicerină, tartraţi, glucide.

În ţara noastră, I. Vasilescu (1966) a pus la punct un procedeu simplu de obţinere a unui preparat enzimatic de invertază, obţinut prin plasmoliza drojdiei de panificaţie cu NaCl 3%, urmată de autoliză la 55°C, timp de 60 de minute, pentru inactivarea sistemului zimazic. Autolizatul se usucă prin atomizare, rezultând o pudră cu activitate invertazică stabilă în timp. Preparatul acţionează optim şi rapid la temperatura de 55 – 60°C şi pH = 4,5.

Utilizări.

Preparatele de invertază se folosesc ca adaos la formula de preparare a miezului moale al bomboanelor îmbrăcate în ciocolată. Invertaza se omogenizează în sirop de zahăr, suspensia obţinută adaugându-se la masa de fondant. Fasonarea şi glazurarea bomboanelor se face cu miezul consistent. Cu timpul, prin invertaza existentă în miez, zahărul este hidrolizat, obţinându-se o cremă moale, localizată în interiorul miezului.

Preparatele de invertază se folosesc şi la obţinerea zahărului invertit, destinat băuturilor nealcoolice, lichiorurilor, înghetatei, diverselor concentrate alimentare. Zahărul invertit, spre deosebire de zaharoză este mai dulce şi având o solubilitate mai mare nu cristalizează. Aceste proprietăţi permit folosirea zahărului invertit la fabricarea lichiorurilor, a înghetatei şi a altor produse zaharoase, evitându-se cristalizarea zahărului datorită concentraţiei mari (72% la lichioruri) sau înghetării la înghetată.

Zahărul invertit obţinut pe cale enzimatică este superior zahărului invertit obţinut cu acizi, care duc la formarea de furfurol.

2. Poliozidaze

Cele mai importante sunt amilazele, celulazele şi enzimele pectolitice.

1. Amilaze

Întrucât obţinerea acestor enzime din plante este costisitoare şi anevoioasă, s-a căutat altă sursă de obţinere a lor. Această sursă o constituie microorganismele, care produc cantităţi mari de amilaze extracelulare, pe care le secretă în mediul de cultură de unde pot fi uşor izolate şi purificate.

Microorganismele folosite pentru producerea de amilaze. Microorganismele folosite pentru producerea de amilaze sunt bacteriile şi mucegaiurile. Dintre bacterii, specii ale genului *Bacillus* ca: *B. subtilis, B. polymyxa, B. amiloliquefaciens, B. macerans, B. stearothermophillus*; ale genului *Streptomyces* şi genului *Clostridium.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dintre mucegaiuri, specii ale genului *Aspergillus* ca: *A. oryzae, A. niger, A. wentii, A. awamori*; ale genului *Rhizopus* ca: *R. tonkinensis, R. delemar* şi unele specii ale genului *Mucor*.

Complexul amilazic microbian. Microorganismele posedă toate enzimele complexului amilazic, adică: enzime care catalizează hidroliza legărturilor 1-4 α–glicozidice şi 1-6 α-glicozidice din amidon.

Enzimele care catalizează hidroliza legăturilor 1-4 α– glicozidice sunt: α-amilaza, β-amilaza şi glucoamilaza (amiloglucozidaza).

α-Amilaza (α-1-4 glucan 4 glucanohidrolaza) se întâlneşte în regnul vegetal, în regnul animal şi la microorganisme (bacterii şi mucegaiuri). α–Amilazele sunt Ca^{2+}-metaloproteine, care prin hidroliză eliberează hidroxilul glicozidic în poziția α. Sunt **endoenzime** pentru că hidrolizează legăturile 1-4 α–glicozidice din interiorul macromoleculei de amiloză şi amilopectină, formând puțină maltoză şi multă dextrină, motiv pentru care se mai numesc şi dextrinogen-amilaze (Fig. 35). α–Amilazele nu pot hidroliza legăturile 1-6 α–glicozidice, dar le pot ocoli, aceste legături aflându-se la sfârşitul reacției în dizaharidul izomaltoză. În urma hidrolizei amidonului de către α–amilază are loc lichefierea rapidă a amidonului cu formare în final de multă dextrină, puțină maltoză şi izomaltoză.

β-Amilaza (α 1-4 glucanmaltohidrolază) se întâlneşte în regnul vegetal şi la microorganisme şi anume, la bacterii (*Bacillus cereus var. mycoides, B. polymyxa, Pseudomonas sp., Streptomyces sp.*). Hidrolizează numai legăturile 1-4 α–glicozidice de la capetele nereducătoare ale lanțurilor de amiloză şi amilopectină, eliberând hidroxilul glicozidic în poziția β şi formând maltoză (Fig. 35), deci este o **exoenzimă**. În cazul amilozei, β-amilaza eliberează maltoza, moleculă cu moleculă, până la lichidarea lanțului. La amilopectină se întâmplă la fel, până când ajunge la o ramificație α1-6, pe care, neputând să o hidrolizeze, nici să o ocolească, actiunea ei încetează. Ca urmare, amilopectina este hidrolizată în proporție de 60% în maltoză, iar restul, rămâne sub formă macromoleculară, numită dextrină limită sau β–dextrină. Sub acțiunea β-amilazei se formează mult zahăr reducător, respectiv maltoză, motiv pentru care acestă enzimă se numeşte şi zaharogen-amilază. În concluzie, în urma hidrolizei amidonului de către β–amilază rezultă în final multă maltoză şi dextrină limită.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

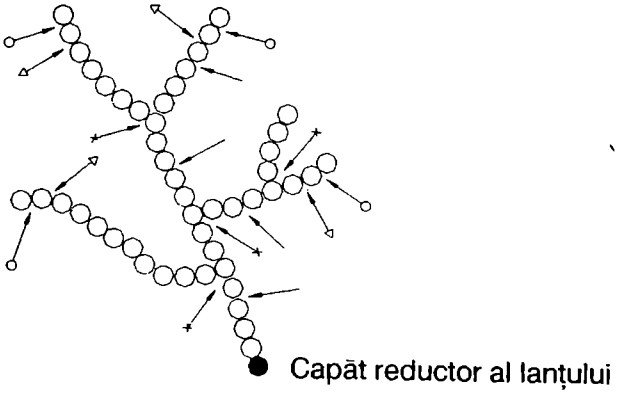


Fig. 35 – Mecanismul hidrolizei amidonului de către amilaze

α – amilaze
β – amilaze
glucoamilaze
pullulanaze, izoamilaze

Glucoamilaza (amiloglucozidaza, α1-4 glucan glucohidrolaza) se întâlneşte numai la microorganisme şi anume, la mucegaiuri (*Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*). Este o **exoamilază**, deoarece hidrolizează legăturile 1-4 α– glicozidice din amiloză şi amilopectină de la capetele nereducătoare ale lanțurilor, eliberând însă glucoză (Fig. 35). enzima nu poate hidroliza legăturile 1-6-α-glicozidice, dar le poate ocoli. În urma hidrolizei amidonului de către glucoamilază rezultă în final multă glucoză, dextrină şi izomaltoză.

Enzimele care hidrolizează legăturile 1-6 α–glicozidice se întâlnesc numai la microorganisme şi sunt:

Dextrinaza limită este produsă de mucegaiuri şi catalizează hidroliza legăturilor 1-6 α–glicozidice din dextrina limită şi din izomaltoză, producând glucoză; este deci o **exoenzimă**.

Pullulanaza şi izoamilaza catalizează hidroliza legăturilor 1-6 α–glicozidice direct din amilopectină eliberând fragmente mai mici şi maltotriază; sunt deci **endoenzime** (Fig. 35). Ambele enzime sunt produse de bacterii şi anume, pullulanaza este produsă de *Enterobacter aerogenes, B. polymyxa, Strteptomyces sp.*, iar izoamilaza de: *Pseudomonas amyloderamosa, Agrobacterium sp., Erwinia sp., Pediococcus sp., Leuconostoc sp.*.

Amilaze bacteriene.

α-Amilaze. Un mare număr de bacterii elaborează α–amilaze: *Bacillus subtilis, Bacillus polymyxa, B. amyloliquefaciens, B. stearothermophilus, B. licheniformis, B. macerans.*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Unele dintre acestea sunt amilaze zaharogene, adică produc mai mult zahăr prin hidroliza amidonului, ca de exemplu, cele produse de *B. subtilis Marburg, B. subtilis var. amylosaccharitícus, B. nalto, B. polymyxa*. Altele nu produc zahăr, dar lichefiază rapid amidonul, datorită formării în cantitate mare de dextrine, cum sunt cele produse de *B. amyloliquefaciens, B. licheniformis*.

O particularitate prezintă α–amilazele produse de *B. macerans* în sensul că sub acțiunea lor amidonul este transformat în dextrine ciclice nereducătoare şi nefermentescibile, formate din 6,7 şi 8 unități de glucoză. Cele mai importante α–amilaze produse industrial sunt cele produse de diferite tulpini de *B. subtilis*, precum şi de *B. amyloliquefaciens, B. stearothermophilus* şi *B. licheniformis*.

Biosinteza α–amilazei începe în timpul fazei logaritmice de dezvoltare şi atinge maximul în faza staționară de creştere, când apar sporii, fiind corelată cu sporularea. Din acest punct de vedere, este de menționat faptul că tulpinile de *B. subtilis* prezintă fenomenul de **disociere**, adică trecerea, în anumite condiții de mediu, de la forma "R" tipică (colonii de tip "R") şi sporulată, la forma "S" (colonii de tip "S") deseori asporogenă. Important este faptul că formele "S" sunt slab active sau chiar inactive.

Pentru evitarea fenomenului de disociere, trebuie îndeplinite următoarele condiții de mediu: pH = 6,5 – 7,5, cu un optim de 6,7; temperatura de 37°C; prezența Ca^{2+} şi Mn^{2+} în concentrații oligodinamice.

Alți factori care influențează biosinteza enzimei sunt aerarea şi compoziția mediului de cultură sub raportul sursei de carbon. Astfel, biosinteza α–amilazei este indusă de prezența în mediu a amidonului sau a maltozei, lactozei şi galactozei. Glucoza are efect represor, prin mecanismul de represie prin catabolit. Biosinteza α–amilazei este un proces intens aerob, fiind inhibat în anaerobioză, deoarece şi microorganismele utilizate sunt strict aerobe.

α-Amilaza bacteriană prezinta o serie de caracteristici care o deosebesc net de α–amilaza fungică şi anume:

- lipsa din moleculă a cisteinei şi cistinei; nu posedă deci grupări –SH şi –S-S;
- prezența unui atom de Zn, care se poate îndepărta uşor, ducând la scindarea macromoleculaei enzimei în două părți egale, omogene electroforetic, ceea ce a dus la concluzia că α–amilaza bacteriană este un dimer, în care monomerii sunt uniți printr-un atom de Zn. Desi monomerul este enzimatic activ, enzima nu poate cristaliza decât ca dimer. Monomerul liber de Zn, conține 1-2- atomi de calciu pe mol;
- este activată de ionul clor ca şi α–amilazele de origine animală;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- termostabilitate remarcabilă, fiind active la 75°-80°C, mergând până la 95°C (*B. stearothermophilus, B. licheniformis*).

β-Amilaze

β-Amilazele bacteriene sunt mai rezistente la căldură (>70°C) decât cele de origine vegetală, iar indicele pH optim este de asemenea mai ridicat (aprox. 7,0). În contrast cu α–amilaza nu necesită calciu pentru stabilitatea şi activitatea enzimatică. Sunt produse de: *B. cereus var. mycoides, B. polymyxa, Pseudomonas sp., Streptomyces sp.*.

Amilaze fungice

α-Amilaze

Mucegaiurile producătoare de α–amilază sunt: *Aspergillus oryzae* şi *A. niger*, enzimele respective fiind şi cele mai bine studiate. Conţin în moleculă Ca^{2+}, care le stabilizează suprastructura; pH optim de activitate este de 4,8 – 5,8, iar temperatura optimă de activitate este de 50°C, la 60°C fiind inactivate.

α-Amilazele produse de speciile genului *Aspergillus* sunt de două tipuri: acidostabile şi acidolabile.

α-Amilaza acidostabilă este produsă de reprezentanţi ai grupului "*Niger*" şi prezintă următoarele caracteristici: masă moleculară de 58.000 daltoni; aminoacid N-terminal: alanina, iar aminoacidul C-terminal: valina; conţine 24 de moli de manoză şi 4 moli de hexozamină pe molul de enzimă; are o termostabilitate ridicată.

α-Amilaza acidolabilă este produsă de reprezentanţii grupului "*Flavus – oryzae*" şi prezintă următoarele caracteristici: masă moleculară de 51.000 daltoni; aminoacid N-terminal: leucina, aminoacid C-terminal: serină, glicină sau alanină; nu conţine resturi de glucide în moleculă. Ambele tipuri de α–amilaze conţin o grupare –SH şi 1-10 atomi gram de Ca^{2+} pe molul de enzimă; 9 atomi gram de Ca^{2+} pot fi îndepărtaţi fără pierderea activităţii enzimatice, dar îndepărtarea completă a Ca^{2+} duce la pierderea totală a activităţii, precum şi la modificarea reactivităţii chimice a grupării –SH, ceea ce demonstrează cuplarea grupării –SH cu unul din atomii de calciu, aceasta jucând rol esenţial pentru menţinerea conformaţiei active catalitice a moleculei proteice.

Glucoamilaza (Amiloglucozidaza) este produsă alături de α–amilază de către: *Aspergillus oryzae, A. niger, A. awamori şi Rhizopus sp.* În stare purificată a fost obţinută *din A. oryzae şi A, niger*. Valoarea pH optimă de activitate este pentru glucoamilaza din *A. oryzae* de 4,2 – 5,2 şi de 3,8 – 4,8 pentru cea din *A. niger*. Temperatura optimă de activitate este de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

60°C pentru ambele enzime. Glucoamilazele sunt glicoproteine, în care manoza este prezentă frecvent în moleculă.

Cercetările au arătat că mucegaiurile produc forme multiple de glucoamilază izoenzime. Astfel, *A. oryzae* produce trei glucoamilaze izoenzime, notate convențional cu I, II, III, care diferă între ele ca proprietăți enzimatice, deşi au proprietăți fizico-chimice identice. De exemplu, glucoamilaza I diferă ca activitate de deramificare şi hidroliză a amidonului nativ, față de glucoamilazele II şi III, care au activitate slabă din acest punct de vedere.

Utilizările practice ale preparatelor amilolitice microbiene

Cele mai importante utilizări practice ale preparatelor amilolitice microbiene sunt redate în Tabelul 9.

De exemplu, în industria spirtului şi a berii înlocuirea malțului de orz se poate face cu un preparat amilolitic fungic (*A. oryzae*) sau mai bine, cu un preparat de α–amilază bacteriană (*B. subtilis*) şi amiloglucozidază fungică. În panificație, pentru ameliorarea calității făinurilor sărace în β–amilază se poate folosi un preparat amilolitic fungic (*A. awamori*). Acest lucru este necesar, deoarece cantitatea de zahăr preexistentă în făină este mică, aşa încât fermentația alcoolică necesară creşterii aluatului este întreținută de maltoza care se formează sub acțiunea β–amilazei din făină. Făinurile sărace în β–amilază dau aluaturi care nu cresc suficient, iar pâinea este de calitate inferioară.

În industria amidonului, la fabricarea dextrinei şi a glucozei se folosesc preparate amilolitice bacteriene (*B. subtilis*).

În industria textilă, preparatele amilolitice bacteriene (*B. subtilis*) se folosesc la îndepărtarea amidonului de pe fibrele de bumbac, proces numit dezancolarea fibrelor. Pentru protejarea fibrelor de bumbac de roadere în timpul țeserii, ele se acoperă înainte de țesere cu un strat de amidon gelatinizat, care trebuie îndepărtat după țesere. Se preferă preparatele amilolitice de *B. subtilis*, active la temperaturile înalte (70°– 90°C) la care se lucrează.

Dat fiind numeroasele utilizări ale amilazelor microbiene, o serie de țări ca Japonia, S.U.A., Germania au dezvoltată o puternică industrie producătoare de enzime microbiene. În afara microorganismelor folosite curent (*B. subtilis, A. oryzae, A. niger*) la ora actuală se produc preparate amilolitice cu grad superior de stabilitate termică, obținute din bacterii termofile ca *B. stearothermophilus*, care păstrează 90% din activitatea inițială după o oră de incubare la 90°C sau ca *B. licheniformis*, care rezistă 5 minute la 105°C, fără să-şi piardă activitatea.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul 9. Utilizările practice ale preparatelor amilolitice microbiene.

Industrie	Sursa		Aplicații
	Bacillus sp.	Aspergillus sp.	
Industria amidonului	+	-	Lichefierea amidonului pentru producerea de glucoză, maltoză.
Morărit și panificație	-	+	Ameliorarea făinurilor deficiente în β-amilază.
Industria spirtului și a berii	+	+	Zaharificarea materiilor prime. amidonoase, înlocuind parțial, sau total malțul de orz.
Industria hârtiei	+	-	Lichefierea amidonului fără producerea de zahăr, pentru dimensionarea hârtiei.
Industria textilă	+	-	Dezancolarea fibrelor.
Industria alimentară	+	-	Ameliorarea utilizărilor furajelor tratate enzimatic pentru creșterea păsărilor și viteilor.
Industria zahărului	+	-	Ameliorarea filtrabilității sucului de sfeclă de zahăr prin degradarea amidonului din suc.
Industria detergenților	+	-	Creșterea puterii de curățire a detergenților.

2. Celulaze

Celuloza este cel mai comun dintre toți compușii organici produși în natură. Ca principal component al peretelui celular, ea reprezintă o proporție considerabilă a întregului material vegetal. O mare cantitate de celuloză se produce în urma procesului de fotosinteză. Producția netă anuală a fotosintezei este de 1,8 x 10^{12} tone de substanțe biodegradabile, din care 40% o constituie celuloza.

Celuloza este componentă majoră a deșeurilor agricole (paie, frunze, lujere de plante, coceni de porumb, coji și păstăi), a deșeurilor din prelucrarea alimentelor (coji de fructe, decoct), a deșeurilor lemnoase (vreascuri, așchii, țăndări, scoarță de copac, rumeguș, hârtie mărunțită) și a deșeurilor solide menajere. Problema reutilizării acestor deșeuri este în prezent de mare importanță, ca o consecință a două fenomene, ce ridică din zi în zi, tot mai multe probleme: criza energetică și poluarea. Deoarece, amândouă aceste probleme sunt de tot mai mare actualitate, se fac în toate țările cercetări pentru utilizarea și recircularea substanțelor celulozice. În acest context, este de înțeles importanța deosebită pe care o prezintă microorganismele producătoare de celulaze, enzime care degradează celuloza.

Structura și reactivitatea celulozei. Celuloza este un poliglucozan, în care resturile de glucoză sunt unite prin legături β-4 glicozidice, unitatea de structură fiind celobioza. Lanțurile

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

de glucoză au o structură liniară, plană; de aici rezultă şi diferenţa fundamentală dintre amidon şi celuloză. Macromoleculele de amidon posedă o structură helicoidală, ceea ce antrenează o solubilizare şi o dispersare foarte avansată. Dimpotrivă, macromoleculele de celuloză, din cauza structurii lor plane, în prezenţa apei nu pot da decât agregate mari, puţin dispersabile. Aranjamentul lanţurilor liniare ale celulozei este caracteristic şi contribuie de asemenea la conferirea unei hidratări foarte dificile. Lanţurile liniare şi plane de β1-4 glucoză se aşează unele sub altele, paralel, legându-se între ele prin legături de H între grupările de alcool secundar ale moleculelor de glucoză, aparţinând la două lanţuri diferite. Legăturile de hidrogen se reproduc cu o periodicitate variabilă, după originea vegetală, de unde aparenţa **reticulată** zisă "**cristalină**" a acestor lanţuri lungi. În urma cercetărilor cu raze X a reieşit că toate celulozele vegetale au o structură mixtă: **cristalin-amorfă**, deoarece macromoleculele nu sunt aşezate paralel pe toată lungimea lor, ci numai în anumite regiuni, numite **cristalite**. În alte regiuni, macromoleculele au o aşezare neregulată, amorfă, lasând goluri între ele. Cercetări mai recente (1996) au stabilit în celuloza din bumbac existenţa chiar a trei regiuni: **o regiune cristalină**, **o regiune amorfă** şi **o regiune semicristalină**. Când se produce o ruptură a acestei structuri organizate, cristaline se formează o zonă neorganizată, sau **amorfă**, accesibilă pătrunderii microorganismelor sau atacului enzimatic.

Lanţurile de glucoză sunt unite în pachete de aproximativ 20, alcătuind **microfibrile**, sau **peretele secundar**, cu o grosime de 3-4 μm. Ele sunt înconjurate de un perete dublu protector, **peretele primar**, cu o grosime de 0,1 μm, cu o structură spiralată şi răsucită, foarte rezistentă la acţiunea agenţilor externi. Cei doi pereţi, primar şi secundar sunt uniform constituiţi din molecule de β–D-glucoză, legate 1-4, dar gradul de polimerizare este diferit. Peretele extern, primar este caracterizat printr-un grad de polimerizare de 2000 – 4000 de unităţi şi rezultă printr-o biosinteză lentă şi progresivă. Peretele secundar are un grad de polimerizare mai ridicat: 14.000 şi este sintetizat foarte rapid. După cum se observă majoritatea celulozei se află în peretele secundar.

În celula vegetală celuloza este asociată cu cantităţi variate de substanţe străine, printre care în principal hemiceluloze şi lignină, raportul între celuloză şi acestea fiind de 4:3:3. În afara acestora se mai întâlnesc: pentozani, răşini, lipide, substanţe minerale. De exemplu, paiele de cereale şi tărâţele de grâu conţin pentozani, în special xilan. Bumbacul, în schimb este celuloză aproape pură: 88 – 96%.

Reactivitatea chimică şi enzimatică a celulozei este legată de prezenţa funcţiunilor de alcool primar şi secundar, care în celuloză sunt aproape toate legate. Observaţia a arătat că

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

celuloza este mai reactivă la nivelul zonelor amorfe, zone in care grupările hidroxil nu sunt legate unele de altele. Este deci necesar, pentru a mări reactivitatea celulozei de a rupe aceste legături. Acesta este principiul preparării substraturilor celulozice artificiale însolubile şi solubile.

În cazul celulozelor insolubile tip: celuloză umflată, celuloză umflată prin incluziune şi celuloză precipitată, are loc o rupere a legăturilor de hidrogen şi o mărire a spațiului dintre microfibrile prin hidratare, cu păstrarea structurii microcristaline.

În cazul celulozelor solubile, sau substituite, tip carboximetil-celuloză (CMC), are loc o rupere a legăturilor de hidrogen sub acțiunea alcalilor, grupările alcoolice primare şi secundare fiind progresiv esterificate sau eterificate.

Microorganismele celulozolitice, aparțin bacteriilor şi fungilor microscopici. Dintre bacterii, un mare număr de bacterii aerobe şi anaerobe sunt capabile să degradeze celuloza. Ele se găsesc în sol, ape, gunoi de grajd, rumenul rumegătoarelor. Dintre acestea amintim bacteriile celulozolitice aerobe ca: *Cytophaga sp., Cellvibrio sp., Cellfalcicula sp., Cellulomonas sp.* şi actinomicete din genul *Streptomyces*. Dintre fungii microscopici, mucegaiurile produc cantități mari de celulaze şi anume: *Trichoderma sp. (Trichoderma viridae, T. lignorum, T. koningii), Aspergillus sp. (A. niger, A, terreus), Penicillium sp. (P. notatum), Fusarium sp. (Fusarium roseum), Chaetomium sp. (C. globosum), Mucor sp. (Mucor pusilus), Mycothecium verrucaria.*

În ce priveşte localizarea, celulazele bacteriene sunt intracelulare, fiind localizate în spațiul periplasmic, sau legate de membrana plasmatică. De aceea, ele difuzează greu în mediul de cultură şi aceasta explică de ce, în majoritatea cazurilor nu se constată o activitate celulazică în filtratul de cultură bacterian.

Celulazele fungice în schimb, sunt totdeauna extracelulare, fiind localizate pe suprafața peretelui celular, de care sunt legate, dar nu foarte ferm şi de aceea, se eliberează în mediu, de unde, pot fi uşor izolate şi purificate. Acesta este şi motivul pentru care majoritatea studiilor asupra complexului celulazic s-au făcut pe mucegaiuri şi obținerea primelor preparate enzimatice celulazice de uz industrial provine de la mucegaiuri.

Spre deosebire de celulaze, celobiazele, atât fungice, cât şi cele bacteriene sunt totdeauna intracelulare. Celulazele fungice şi majoritatea celor bacteriene sunt enzime induse, cel mai bun inductor fiind celuloza insolubilă, sau celobioza, în concentrație foarte mică.

Modul de atac al celulozei de către microorganisme. În general, microorganismele atacă celuloza acolo unde şi-a pierdut structura reticulată (cristalină) în favoarea unei structuri mai laxe, zisă amorfă. Modul de pătrundere şi liza depind de natura microorganismului:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- Sporii ciupercilor, după ce traversează dubla anvelopă protectoare a fibrilei de celuloză, ating lumenul său, se dezvoltă aici şi lizează fibra progresiv, din interior către exterior.
- Bacteriile din genul *Cytophaga* se fixează pe fibra de celuloză şi adaptarea microorganismului la substratul său este cu atât mai perfectă, cu cât microorganismul posedă un perete celular suplu şi deformabil, liza producându-se în acest caz, de la exterior catre interior.
- Bacteriile din genul *Cellvibrio*, caracterizate printr-o mare mobilitate, gravitează la extremitățile fibrei, ruptă în mod natural, căutând aici posibilitatea de pătrundere, în legătură cu microcapilaritatea fibrei; deci, liza se produce şi în acest caz de la exterior catre interior.

Deci, oricare ar fi microorganismul considerat, atacul fibrei de celuloză este în mod esențial localizat şi presupune contact direct între microorganism şi substrat, în strânsă legătură cu structura sa şi cu dimensiunile proprii.

Observarea microscopică a fibrelor de celuloză atacate de microorganisme permite să se distingă în acest proces biologic de degradare două faze:

- Prima fază a degradării este caracterizată prin deşirarea peretelui primar al fibrei, peretele dublu protector şi eliberarea peretelui secundar, care suferă o rearanjare parțială în partea sa externă. Ca urmare a acestei modificări, rezultă o umflare a fibrei şi formarea unei celuloze solubile în alcali (NaOH 18%), fără modificarea gradului de polimerizare, a rezistenței la tracțiune şi a puterii reducătoare. O serie de cercetători, printre care Reese şi Gilligan (1954) au susținut că acest fenomen este datorat unei enzime produsă de fungi; pe care au numit-o **factorul de umflare** (*swelling factor*), sau **S-factor** şi l-au inclus în enzimele Cx. Alți cercetători (1962) susțin că umflarea este cauzată de efectul sinergic al mai multor celulaze care acționează împreună în atacul celulozei native. Pe de altă parte, s-a mai arătat că umflarea fibrei de celuloză şi solubilitatea în alcali este o proprietate în special a regiunii semi-cristaline a fibrei de celuloză, care în urma atacului de către celulază trece la o stare amorfă, care poate absorbi mai mult alcaliile.
- A doua fază a degradării este caracterizată prin transformarea structurii cristaline a peretelui secundar într-o structură amorfă; această modificare se datoreşte ruperii legăturilor de hidrogen de la nivelul hidroxililor aparținând la molecule de glucoză din două lanțuri vecine. Aceasta are drept consecință umflarea intra- şi extracelulară a fibrei; celuloza devine hidratabilă şi ca urmare are loc o depolimerizare rapidă cu formare de lanțuri scurte, solubile progresiv şi apariția de zaharuri reducătoare: celobioză şi glucoză,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

totodată fibra îşi pierde întreaga sa rezistenţă la tracţiune. Enzimele implicate în acest proces aparţin componentei Cx.

Complexul celulazic microbian.

Conceptul C_1 – Cx.

Reese şi colaboratorii săi au sugerat primii în anul 1950, un mecanism privind degradarea enzimatică a celulozei, care a primit denumirea de conceptul C_1 – Cx. Conform acestui concept, degradarea celulozei native are loc în două trepte succesive: în prima treaptă acţionează enzima numită de Reese C_1, care dezagregă lanţurile de celuloză; în a doua treaptă acţionează enzima Cx, care realizează depolimerizarea şi hidroliza la celobioză. În final, celobioza este hidrolizată de celobiază (o β–glicozidază) la glucoză (Fig. 36).

Se observă din Fig. 36 că Reese si colaboratorii săi susţin ideea că enzima C_1 are funcţie nehidrolitică, dar este necesară pentru a asigura hidroliza celulozei de către Cx, singura enzimă cu funcţie hidrolitică. Conform aceleiaşi teorii, cele două enzime acţionează succesiv asupra fibrelor de celuloză.

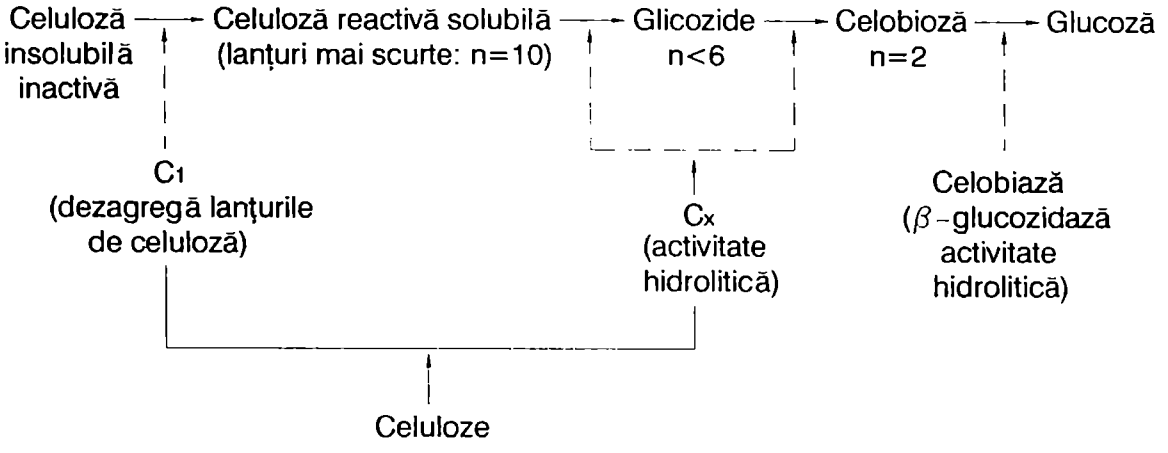


Fig. 36 – Conceptul C_1 – C_X pentru degradarea celulozei

Componentul C_1. După 1964 s-au făcut studii intense asupra componentului C_1, aducându-se dovezi incontestabile asupra existenţei acestui component în filtratele de cultură de la *Trichoderma viridae, Trichoderma koningii, Fusarium solanii*. Odată cu perfecţionarea tehnicilor de fracţionare şi purificare enzimatică, s-a constatat că enzima C_1 are de fapt o funcţie hidrolitică, ceea ce contrazice conceptul lui Reese. În prezent, dovezile experimentale aduse susţin în mod clar ideea că C1 este o enzimă cu funcţie hidrolitică şi anume o **β-1-4-glucan-celobiohidrolază** (CBH), eliberând unităţi de celobioză de la capetele nereducătoare ale lanţului celulozic, deci având un mecanism de exoenzimă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Componenții Cx. Sunt enzime numite β1-4-glucanaze, indicația x în Cx subliniind natura multicomponentă (multienzimatică) a fracțiunii respective. Sunt de două tipuri:

a) endo-β-1-4-glucanaza, cu mecanism de endoenzimă, deoarece scindează legăturile β1-4 glicozidice din interiorul lanțurilor de celuloză, eliberând fragmente mai mici, care vor fi atacate ulterior de exoglucanaze. Spre deosebire de C_1 care nu poate ataca celuloza cristalină, endo-β-1-4-glucanaza acționează direct asupra acesteia.

b) exo-β-1-4-glucan-glucohidrolaza cu mecanism de exoenzimă, deoarece eliberează succesiv unități de glucoză de la capetele nereducătoare ale lanțurilor de celuloză. Enzima acționează asupra fragmentelor solubile formate din 4-7 unități de glucoză, produse sub acțiunea endo β1-4-glucanazei şi ca atare, împreună cu enzima C_1 şi cu endo-β1-4-glucanaza joacă un rol important în hidroliza totală a celulozei.

Celobiaza (β-glucozidaza)

Celobiazele (β-glucozidazele) nu sunt celulaze. Ele hidrolizează celobioza rezultată din acțiunea celulazelor la glucoză.

Sinergismul între componenții enzimatici şi actuala reformulare a conceptului C_1 - Cx.

În momentul de față este bine stabilit că celulaza este un complex enzimatic multicomponent şi că celuloza cristalină este hidrolizată prin sinergism de către aceşti componenți şi nu prin acțiunea succesivă a lor aşa cum presupunea Reese.

Wood a separat componenții C_1 şi Cx din celulaza de *Trichoderma koningii* şi a observat că fracțiunea conținând activitate Cx reținea numai 3% din activitatea celulazică a filtratului de cultură original, iar cea conținând activitate C_1 reținea numai 1%. Totuşi, când cele două fracțiuni au fost recombinate în proporțiile lor originale, 96% din activitatea celulazică a filtratului de cultură original a fost redobândită. Este clar că acțiunea complexului celulazic este dependentă de acțiunea sinergică a componentului C_1 cu ceilalți componenți. Pe baza acestor constatări, conceptul C_1-Cx al lui Reese şi mecanismul acțiunii celulazelor trebuie reformulat în sensul că: degradarea celulozei este opera acțiunii sinergice a endo-β1-4-glucanazelor şi exo-β-1-4-glucanazelor (Fig. 37) şi în final a celobiazelor (β-glucozidaze).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

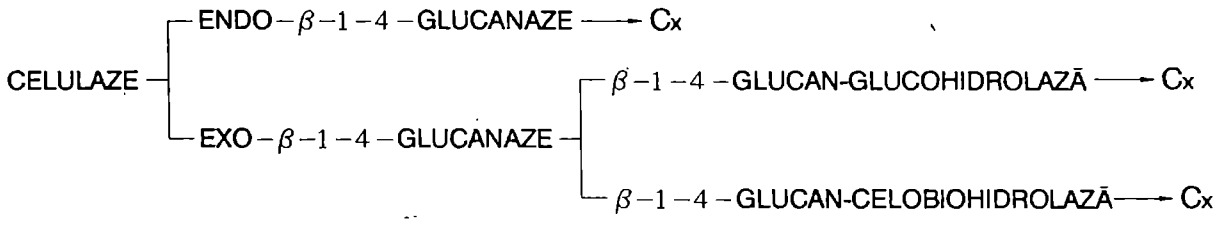


Fig. 37 – Sinergismul acțiunii celulazelor și reformularea conceptului C_1 - C_x

Proprietăți.

- **Compoziție chimică**: celulazele sunt glicoproteine, raportul glucide/proteine fiind de 1. Glucidul care apare cel mai des este manoza. În cantitate mai mică pot apare: glucoză, arabinoză, glucozamină. S-a constatat că există un paralelism între activitatea celulazică și concentrația de glucide: cu cât concentrația în glucide este mai mare, cu atât acțiunea față de substrat este mai importantă.
- **Condiții de activitate: - pH:** în general enzimele de origine fungică sunt active la un pH cuprins între 2,0 și 8,0, cu un optimum între 4,0 și 5,0. Activitatea celulazică a bacteriilor se situează la un pH mai ridicat, între 4,5 și 9,0, cu un optimum între 6,0 și 7,0;
  - **temperatura:** mucegaiurile prezintă activitate celulazică maximă la 50°C, bacteriile mezofile între 25° – 32°C, iar bacteriile termofile la 55°C, fără ca să existe neapărat un paralelism între temperatura optimă de cultivare și cea de activitate.
  - **inhibitori:** inhibitorii specifici ai celulazelor sunt inhibitorii competitivi, care prezintă asemănare structurală cu produșii inițiali de hidroliză. Printre aceștia, celobioza este inhibitorul cel mai specific, atunci când se află în concentrație mare. Alți inhibitori sunt unii inhibitori naturali ca: fenoli, taninuri, precum și unii ioni metalici ca: Ag^+, Hg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}.

Importanța practică.

Preparatele enzimatice celulazice câștigă tot mai mult în importanță, în primul rând datorită faptului că celuloza ar putea deveni o nouă sursă de energie. Conversia celulozei în diferite forme de energie se poate realiza prin diferite metode, metoda enzimatică fiind calea cea mai ușor abordabilă în viitor. La ora actuală, conversia biomasei celulozice în zaharuri fermentescibile poate ajuta la mărirea resurselor de petrol, deoarece, fermentația zahărului dă

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

etanol, care, când este utilizat ca *gazohol* (un amestec de 10% etanol şi 90% benzină) lărgeşte rezervele de benzină.

Preparatele enzimatice celulazice se folosesc şi în industriile fermentative care folosesc ca materii prime deşeuri celulozice. Astfel, în mediul care conţine celuloză şi un preparat celulazic se inoculează *Saccharomyces cerevisiae* şi se obţine o producţie de etanol de 1,7 – 2,2 % în câteva ore.

Celulazele se pot folosi şi pentru producerea de proteine. La un mediu unde sursa de carbon este celuloza, dacă se adauga microorganisme care pot produc celulaze, se obţin cu ajutorul lor glucide simple, pe care se pot dezvolta alte microorganisme care pot produce o mare masă de proteine. De multe ori, chiar microorganismele celulozolitice sunt bune producătoare de proteine, ca de exemplu, mucegaiul *Chaetomium cellulolyticum*, care manifestă un atac rapid asupra diferitelor surse de celuloză nativă şi totodată, dă un produs cu conţinut ridicat de proteine, folosit cu rezultate remarcabile în nutriţia animalelor. Dat fiind aceste utilizări, în momentul de faţă, există deja firme care fabrică celulaze purificate, în Japonia, Germania (firma Merck). Microorganismele cel mai des utilizate sunt mucegaiurile din genurile: *Trichoderma, Aspergillus, Penicillium, Rhizopus*. Firmele respective livrează preparatele celulazice ca atare, sau, pentru o mai bună stabilitate, imobilizate pe fibre de colagen.

3. Enzime pectolitice.

Substanţele pectice: structură. Substanţele pectice sunt constituenţi fiziologici universali ai plantelor, alcătuind lamela mijlocie, care formează legătura dintre membranele celulelor, în peretele celulelor vegetale. În această categorie intră trei grupe de substanţe: **protopectine** (eliberează prin hidroliză **pectine**), **acizi pectinici** şi **acizi pectici**. Toate trei grupele de substanţe sunt **acizi poligalacturonici**, în care, moleculele de acid galacturonic sunt legate prin legături 1-4 α–glicozidice şi esterificate cu metanol. Gradul de esterificare cu metanol diferă la cele trei grupe de substanţe astfel:

- pectine şi acizi pectinici → 75-100% esterificare cu metanol;
- acizi pectici → lipsa completă a esterificătii cu metanol.

Substanţele pectice sunt mai mult sau mai puţin heterogene, conţinând adesea, pe lângă acid poligalacturonic, arabani, xilani, galactani. Sunt însoţite totdeauna de hemiceluloze şi celuloze.

Enzime pectolitice.

Enzimele care catalizează hidroliza substanţelor pectice sunt de două tipuri:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- enzime pectolitice saponifiante sau esteraze, care catalizează demetoxilarea pectinelor prin scindarea legăturilor esterice dintre grupările –COOH şi alcoolul metilic din lanţurile poligalacturonice. Ele se numesc pectin-metil-esteraze (PME) sau pectin-esteraze (PE). PME microbiene diferă sensibil de enzimele similare de origine vegetală şi anume: sunt active la pH= 4,0 – 5,0 (spre deosebire de cele vegetale, care sunt active la pH=7,0 – 8,0) şi sunt mai puţin rezistente la temperatură şi la agenţi chimici decât cele vegetale. PME microbiene sunt produse de bacterii (*Pseudomonas pumicola*) şi de mucegaiuri (*Penicillium chrysogenum, Aspergillus niger, Fusarium oxysporum*).

- enzime pectolitice depolimerizante sau enzime pectolitice propriu-zise. Sunt poliozidaze care catalizează hidroliza legăturilor 1-4 α-glicozidice din acizii poligalacturonici, producând depolimerizarea acestora şi eliberând acid galacturonic.

Sunt de două categorii:

- poligalacturonaze (PG), care catalizează hidroliza acizilor pectici;
- polimetilgalacturonaze (PMG), care catalizează hidroliza pectinelor şi a acizilor pectinici.

Atât PG, cât şi PMG sunt endo- şi exoenzime. Endoenzimele produc o fragmentare a moleculelor substanţelor pectice, pe când exoenzimele eliberează acidul galacturonic, moleculă cu moleculă, începând de la capătul nereducător al lanţului.

Microorganismele producătoare aparţin bacteriilor şi fungilor microscopici, respectiv mucegaiurile. Dintre bacterii: *Bacillus subtilis, Bacillus polymyxa, B. macerans, Clostridium felsineum, C. acetobutylicum*. Dintre mucegaiuri: *Aspergillus sp., Penicillium sp., Rhizopus sp., Mucor sp.*. Cea mai mare importanţă practică o prezintă însă speciile genului *Aspergillus: A. niger, A. oryzae, A. awamori*. De obicei, se folosesc tulpini selecţionate de *A. niger*. Enzimele pectolitice elaborate de mucegaiuri sunt extracelulare, ceea ce explică preferinţa pentru mucegaiuri în scopul obţinerii acestor enzime.

Utilizări practice

Preparatele enzimatice pectolitice fungice se folosesc:

- în industria sucurilor de fructe pentru: ameliorarea extracţiei sucului la presare, prin dezagregarea pereţilor celulari; fabricarea concentratelor de fructe (diverse piureuri fine); clarificarea sucurilor de fructe, care din cauza substanţelor coloidale pectice din soluţie sunt închise la culoare şi vâscoase.
- în industria vinurilor pentru: scurtarea timpului de presare şi mărirea cantităţii de must, uşurând filtrarea şi limpezirea acestuia, precum şi a vinului; grăbirea fermentării mustului;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

mărirea extracției de culoare la prepararea vinurilor roşii, precum şi a unor substanțe de valoare, conținute în bobul de strugure.

2. Proteaze

Sub denumirea de **proteaze** sunt cuprinse toate enzimele care hidrolizează diferitele legături peptidice, prin care sunt uniți aminoacizii în lanțurile polipeptidice, care alcătuiesc macromoleculele substanțelor proteice. Sunt cunoscute şi sub denumirea de peptidaze, proteaze sau enzime proteolitice.

Clasificare

Sistemul enzimatic proteolitic este format din două subclase: **exopeptidaze** şi **endopeptidaze**, în funcție de modul lor de acțiune.

Exopeptidazele catalizează hidroliza legăturilor peptidice terminale, eliberând aminoacizi. Se împart la rândul lor în două subgrupe: aminopeptidaze, care acționează la capetele N terminale ale lanțurilor polipeptidice şi carboxipeptidaze care acționează la capetele C terminale ale lanțurilor polipeptidice. Majoritatea exopeptidazelor, inclusiv cele microbiene, sunt intracelulare şi de aceea, de mai mică importanță practică.

Endopeptidazele catalizează hidroliza legăturilor peptidice din interiorul lanțurilor polipeptidice, eliberând fragmente cu greutate moleculară mică şi mai puțini aminoacizi. Din aceasta categorie fac parte endopeptidazele de origine animală ca: pepsina, tripsina, chimotripsina, endopeptidazele de origine vegetală ca: papaina, ficina, bromelina şi endopeptidazele microbiene. Majoritatea endopeptidazelor, inclusiv cele microbiene sunt extracelulare şi deci, de importanță practică. Din acest motiv, au fost mai mult studiate în comparație cu exopeptidazele. În funcție de centrul catalitic activ, endopeptidazele se împart în patru subgrupe:

1) **serin-proteaze**, au ca centru catalitic activ o grupare de serină. În această categorie intră chimotripsina. Cele microbiene sunt produse de bacterii din genul: *Bacillus, Streptomyces, Arthrobacter*, de drojdii şi de mucegaiuri din genul *Aspergillus*. Serin-proteazele au pH optim de activitate în domeniu foarte alcalin: 10,0-11,0. Cea mai importantă enzimă din această categorie este subtilizina produsă de *Bacillus subtilis*.
2) **Metalproteaze**, au ca centru activ un ion metalic bivalent, de obicei Zn^{2+}. Unele au pH optim de activitate în domeniul neutru, cum este **colagenaza** produsă de

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Clostridium hystolyticum sau **elastaza** produsă de *Pseudomonas aeruginosa*; altele, au un pH optim de activitate în domeiul alcalin între 7,0 şi 9,0 şi sunt produse de bacterii din genul *Serratia* sau *Myxobacter*.

3) **Tiol-preoteinaze (cistein-tiol-proteinaze)**, au ca centru activ o grupare –SH (tiol) liberă provenind din cisteină şi un pH optim de activitate în domeniul neutru, sau alcalin. În această categorie intră tripsina, papaina, bromelina, iar dintre cele microbiene proteinazele produse de *Streptococcus sp.* şi *Clostridium sp.*.

4) **Aspartic-proteaze (proteaze acide)**, au ca centru activ grupări -COOH ionizate provenind de la acidul aspartic şi un pH optim de activitate în domeniul acid: 2,0 – 5,0. În acestă categorie intră pepsina şi renina (din stomacul mamiferelor). Cele microbiene aparţin la două grupe:
   - aspartic-proteaze asemănătoare pepsinei; deci enzime tipic hidrolitice, produse de mucegaiuri din genul *Aspergillus, Penicillium, Rhizopus*;
   - aspartic-proteaze asemănătoare reninei, deci enzime de coagulare, produse de bacterii din genul *Streptomyces* şi de mucegaiuri din genul *Mucor*.

Biosinteza şi reglarea biosintezei proteazelor microbiene.

La bacterii, există o strânsă corelaţie între ciclul de dezvoltare a celulelor, starea fiziologică a acestora şi producerea de proteaze. În general, producerea şi eliberarea proteazei în mediul de cultură are loc la sfârşitul fazei de creştere logaritmică şi este însoţită de sporulare. De exemplu, la variantele "R" de *Bacillus subtilis* s-a observat că activitatea maximă a proteazei alcaline apare în perioada sporulării în masă. Variantele "S" nici nu sporulează, nici nu produc proteinaze extracelulare, ceea ce, este o dovadă în plus, că producerea de proteaze este obligatoriu legată de sporulare. De altfel, s-a constatat că mutantele care şi-au pierdut capacitatea de sporulare nu formează proteaze.

La mucegaiuri, s-a constatat existenţa unei interdependenţe între starea citomorfologică a hifelor şi producţia de enzimă, în sensul că, randamentul maxim este atins în momentul de maximă creştere; şi în acest caz, producerea de proteinaze este corelată cu sporularea.

Reglarea sintezei proteazelor microbiene se face prin mecanisme obişnuite de reglare ca: inducţia sintezei enzimelor, represia sintezei enzimelor şi represia prin catabolit a sintezei enzimelor.

Inducţia sintezei proteinazelor este realizată de aminoacizii şi peptidele din mediul de cultură. Pe de altă parte, aminoacizii pot exercita şi un fenomen de represie a sintezei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

proteinazelor respective, ca urmare a acumulării lor în mediu, sub acțiunea aceloraşi proteinaze.

În sfârşit, represia prin catabolit a sintezei enzimelor este exercitată de glucoză şi alte surse de carbon uşor asimilabile, care inhibă sinteza proteazelor. Pentru a evita această represie, se foloseşte adesea în mediu amidon, ca sursă de carbon lent asimilată.

Preparate enzimatice proteolitice bacteriene

Bacteriile produc în special proteaze alcaline şi neutre. Cele mai importante din punct de vedere practic sunt proteazele alcaline. Astfel, dintre speciile genului *Bacillus*, produc proteaze alcaline: *B. subtilis, B. amyloliquefaciens* şi *B. licheniformis*. Proteaza alcalină produsă de *B. subtilis*, numită subtilizină, are un pH optim de activitate la 10,0 – 11,0, o specificitate mult mai largă decât a pepsinei şi tripsinei şi necesită Ca^{2+} pentru stabilizare. Proteazele produse de *B. amyloliquefaciens* şi *B. licheniformis* sunt similare cu subtilizina în ceea ce priveşteindicele pH optim de activitate şi specificitatea.

Proteaze neutre produc: *B. megaterium, B. cereus, B. polymyxa*, specii ale genului *Streptococcus*, printre care şi streptococii lactici: *Lactococcus lactis* şi *Lactococcus cremoris*, precum şi specii ale genului *Clostridium* ca: *C. hystolyticum*. Proteaza produsă de acesta din urmă, numita colagenază, este identică cu toxina K şi este responsabilă de degradarea colagenului în boala numită gangrenă gazoasă. Speciile genului *Streptomyces* sunt bune producătoare de proteaze neutre şi alcaline. Astfel, *Streptomyces griseus* produce o cantitate mare de proteaze neutre şi alcaline, cunoscute sub denumirtea comercială de **pronază**. Endopeptidaza neutră, care constituie fracția predominantă a acestui preparat enzimatic, are o specificitate extrem de largă, depăşind ca grad de proteoliză a substanțelor proteice, tripsina şi chimotripsina. Unele proteaze produse de specii ale genului *Streptomyces* ca *Streptomyces erythreus* au acțiune coagulantă asemănătoare reninei şi de aceea, pot fi folosite ca înlocuitori ai acesteia la fabricarea brânzeturilor.

Preparatele enzimatice proteolitice fungice.

Mucegaiurile sunt cunoscute de multă vreme ca surse bogate de enzime proteolitice. Speciile de *Aspergillus* se folosesc în orient la pregătirea produselor alimentare din soia, iar anumite specii de *Penicillium* se folosesc la fabricarea brânzeturilor speciale: Roquefort, Camembert. Proteazele elaborate de mucegaiuri se pot grupa, după valoarea pH optimă de activitate în trei grupe:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- proteaze acide cu pH = 3,0 – 4,0. Sunt de două categorii: de tip hidrolitic, asemănătoare pepsinei, produse de *A. niger, A. oryzae, A. awamori, A. saitoi, A. fumigatus, A. candidus* şi de tip coagulant, asemănătoare reninei, produse de *Mucor pusillus* şi *Mucor miehei.*
- proteaze neutre cu pH= 6,0 – 7,0, produse de *A. oryzae, A. sojae, A. terricola, A. fumigatus, Penicillium roqueforti.*
- proteaze alcaline cu pH = 8,0 – 11,0, produse de *A. oryzae, A. sojae, A. fumigatus, A. flavus, A. candidus, Penicillium roqueforti.*

Unele specii de drojdii ca *Yarowia lipolytica, Saccharomyces cerevisiae, Candida tropicalis, Kluyveromyces lactis, Cryptococcus albidus, Torulopsis sp.*, pot produce proteaze extracelulare, dintre care unele sunt de tip coagulant, asemănătoare reninei *(Yarowia lipolytica, Cryptococcus albidus, Torulopsis sp.*).

Utilizările practice ale preparatelor enzimatice proteolitice microbiene.

- **Industria textilă**: fibrele de mătase sunt protejate de roadere în timpul ţeserii, prin aplicarea unui strat de gelatină. Îndepărtarea acestuia după ţesere se face cu enzime proteolitice bacteriene. Aceleaşi preparate se folosesc şi pentru îndepărtarea stratului de sericină de pe fibrele de mătase naturală;
- **Industria detergenţilor**: primul detergent conţinând enzime bacteriene a fost introdus în 1956 sub denumirea de BIO-40. În 1960, Novo Industries A/S a introdus alcalaza, produsă de *Bacillus licheniformis* sub denumirea de Biotex. Proteazele ideale folosite în industria detergenţilor trebuie să aiba o largă specificitate de substrat pentru a realiza îndepărtarea diferitelor pete de alimente, sânge sau alte secreţii. Activitatea şi stabilitatea la pH şi temperatura ridicate, precum şi compatibilitatea cu agenţii oxidanţi sau cei de chelatizare adăugaţi la detergenţi sunt de asemenea importante. Majoritatea enzimelor proteolitice folosite în industria detergenţilor sunt serin-proteaze produse de *Bacillus sp.*.
- **Industria pielăriei**: presupune o serie de procese ca: înmuiere, depilare, batere, tăbăcire, toate având drept scop obţinerea unor piei de calitate superioară. Înlocuirea substanţelor chimice folosite înainte în aceste procese cu preparate enzimatice proteolitice bacteriene sau fungice a fost un succes, înlăturând problemele de poluare create de substanţele chimice şi obţinându-se totodată produse de calitate.
- **Industria alimentară**: cea mai importanta utilizare este în **industria brânzeturilor**, la coagularea laptelui. Renina, preparat enzimatic proteolitic de origine animală a fost înlocuită cu succes cu preparatele enzimatice proteolitice bacteriene (*Streptomyces erithreus*) sau fungice (*Mucor michei, Mucor pusillus*). Atât renina animală, cât şi cea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

microbiană sunt proteaze acide (aspartic-proteaze) cu greutatea moleculară 30.000 – 40.000 daltoni. Alte utilizări sunt:

- **în industria cărnii şi a peştelui** în procesul de frăgezire (maturare) a acestora. Se folosesc proteaze fungice (*Aspergillus terricola*);
- **la obţinerea produselor din soia** (sosul de soia şi alte produse); se folosesc proteaze neutre şi alcaline fungice. Hidrolizatul obţinut este folosit pentru obţinerea băuturilor fortifiate proteic şi a unor alimente dietetice.;
- **în panificaţie**, proteazele fungice (*A. oryzae*) se folosesc ca adaos în aluatul de pâine, îmbunatăţind calitatea glutenului printr-o proteoliză limitată, care determină numai slăbirea reţelei de gluten fără să o distrugă, ceea ce ameliorează calităţile plastice ale aluatului şi uşurează prelucrarea lui;
- **în industria berii**, protezele fungice se folosesc pentru hidroliza proteinelor care determină tulburarea berii;
- **în industria hidrolizatelor proteice** se folosesc enzime proteolitice bacteriene sau fungice. Hidrolizatele obţinute sunt folosite la prepararea prafului de supe, în medicină ca hrană parenterală şi în zootehnie la prepararea nutreţurilor;
- **în sinteza de aspartam**; aspartamul este un dipeptid compus din acid L-aspartic şi esterul metilic al L-fenilalaninei şi este folosit în alimentaţie ca îndulcitor artificial noncaloric. Configuraţia L a celor doi aminoacizi este responsabilă de gustul dulce al aspartamului. Menţinerea stereospecificităţii este deci crucială, ceea ce este dificil prin metode chimice, dar mult mai uşor cu ajutorul proteazelor bacteriene. Un preparat de termolizină din *Bacillus thermoprotolyticus* este folosit pentru sinteza de aspartam.
- **Industria farmaceutică**: lactoza cristalizată se fabrică din zerul rezultat de la fabricarea brânzeturilor. Zerul purificat mai conţine încă substanţe proteice solubile, care creează mari greutăţi. Îndepărtarea acestora se face cu proteaze bacteriene.

3. Amidaze

Amidazele sunt enzime care catalizează hidroliza legăturilor amidice din diverşi compuşi. Cele mai importante din punct de vedere practic sunt **penicilin-acilazele** care catalizează hidroliza legăturilor amidice din catena laterală a penicilinei G, eliberând radicalul benzil sub formă de acid fenilacetic şi nucleul de bază al penicilinei G, acidul 6-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

aminopenicilanic. Penicilin-acilazele sunt produse de drojdii, mucegaiuri şi bacterii. Sunt de două tipuri:

- **Tipul I** cuprinde acilazele fungice poroduse de mucegaiurile din genurile: *Penicillium (P. chrysogenum), Aspergillus (A. ochraceus), Cephalosporium, Fusarium.* Ele acționează asupra penicilinei V (fenoximetilpenicilina), dar atacă mai puțin eficient penicilina G. În afară de penicilina V, ele mai atacă penicilina K (heptil-penicilina) şi penicilina F (pentenil-penicilina)Sunt enzime extracelulare, cu pH optim = 10,0 şi temperatură optimă de 50°C.

- **Tipul II** cuprinde acilazele bacteriene, produse de bacterii din genurile: *Aerobacter, Cellulomonas, Corynebacterium, Escherichia, Erwinia, Micrococcus, Proteus, Pseudomonas, Sarcina, Salmonella, Xanthomonas.* Sunt enzime intracelulare cu pH optim = 8,0 şi temperatura optimă de 40C. Penicilin-acilazele prezintă importanță deosebită pentru obținerea penicilinelor de semisinteza, respectiv pentru obținerea acidului 6-aminopenicilanic din penicilina G (vezi cap. V-Antibiotice). Se foloseşte în acest scop, în exclusivitate penicilin-acilaza din *Escherichia coli* şi anume, din mutante ale acestei bacterii. Enzima este intracelulara, ca toate acilazele bacteriene şi producția ei este represată de glucoză, care din acest motiv trebuie să fie în concentrație mică în mediul de cultură. Producția enzimei este adesea indusă de prezența în mediul de cultură a acidului fenilacetic. Obținerea acidului 6-aminopenicilanic se poate face fie folosind cultura de *Escherichia coli* ca atare, fie mai bine, cu enzima purificată şi imobilizată pe un substrat corespunzător.

3.2 Oxido-reductaze

Sunt enzime care produc oxidări sau reduceri ale diverşilor compuşi. Cea mai importantă dintre acestea este glucoz-oxidaza care realizează oxidarea glucozei la acid gluconic. Este o enzimă extracelulară produsă de mucegaiuri din genurile: *Aspergillus* (*A. niger*) şi *Penicillium* (*P. notatum, P. chrysogenum, P. luteum purpurogenum*). În industrie se preferă pentru producerea acestei enzime fie *A. niger*, fie *P. luteum purpurogenum.*

Enzima este o dehidrogenază care utilizează oxigenul molecular ca acceptor de hidrogen, formând apa oxigenată (H_2O_2). Datorită acesteia glucoz-oxidaza are activitate antibacteriană. S-a constatat că factorul antibacterian din culturile de *P. notatum* numit **notatină** este de fapt H_2O_2 formată în preparatele de glocoz-oxidază. În prezența catalazei , care descompune H_2O_2, efectul bactericid dispare. Întrucât H_2O_2 este toxică, este important ca microorganismul producător de glucoz-oxidază să aibă şi o activitatea catalazică mare pentru a descompune imediat H_2O_2 formată. Din acest punct de vedere *P. luteum purpurogenum*

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

îndeplineşte perfect acestă condiţie, având o activitatea catalazică suficient de mare pentru a descompune H_2O_2 formată. Nu acelaşi lucru se întqmplă cu *P. notatum* şi *P. chrysogenum*, care având o activitatea catalazică mai mică, H_2O_2 rămasă în mediu determină efectul bactericid de care s-a mentionat mai înainte.

Glucoz-oxidaza este o flavoproteină care conţine 2 moli de FAD pe molul de proteină. Este o enzimă înalt specifică, deoarece oxidează numai β-D-glucoza. Într-o primă fază se formează δ–gluconolactona, care se hidrolizează spontan sau sub acţiunea unei enzime la acid gluconic.

3.3 Izomeraze

Cea mai importantă din această categorie este glucozo-izomeraza (D-glucozo-cetoizomeraza) care produce izomerizarea glucozei la fructoză (Fig. 38). Reacţia este reversibilă şi se produce un amestec de glucoză şi fructoză, raportul dintre compuşi depinzând de enzima folosită şi de condiţiile de reacţie, ca de exemplu temperatura.

Un mare număr de bacterii sunt capabile să producă această enzimă. Dintre acestea, cei mai importanţi producători sunt: *Bacillus coagulans, Streptomyces sp., Actinoplanes missouriensis, Arthrobacter sp.*

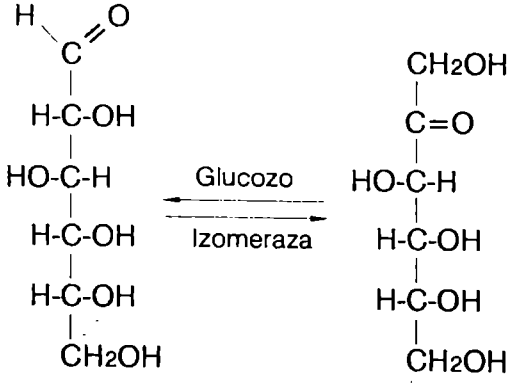


Fig. 38 – Izomerizarea glucozei la fructoză

În prezent, în industrie, se folosesc pentru obţinerea de glucozoizomerază Bacillus coagulans sau *Streptomyces olivaceus* NRRL3588. Enzima produsă de *B. coagulans* este în principal o xilozoizomerază şi de aceea necesita xiloză ca inductor. Întrucât xiloza este scumpă, poate fi înlocuită de xilan sau de tărâţe de grâu, care de asemenea conţin xiloză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Importanța practică a glucozoizomerazei constă în aceea că producerea de fructoză din glucoză este foarte valoroasă, deoarece fructoza este de două ori mai dulce decât zaharoza.

Obținerea fructozei din glucoză se poate realiza şi pe cale chimică la temperatură ridicată şi în mediu alcalin, dar produşii secundari rezultați nu pot fi metabolizați de organismului uman, ceea ce face imposibilă folosirea acestei metode pentru industria alimentară.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL VII

BIODERIVATI (PRODUŞI DE BIOCONVERSIE)

1. Acidul acetic

Producerea acidului acetic, sau oţetul alimentar este de natura microbiană şi prezintă importanţă practică, deoarece oţetul este de neînlocuit în special în alimentaţie, unde se foloseşte drept condiment, sau conservant. Producerea acidului acetic, impropriu numită fermentaţie acetică este de fapt un proces oxidativ, în care, o soluţie diluată de alcool etilic este oxidată de către bacteriile acetice, în prezenţa oxigenului din aer la acid acetic şi apă, conform ecuaţiei de bază:

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3\text{-}COOH + H_2O + 455 \text{ kcal/mol}$$

1.1. Microorganismele producătoare sunt bacteriile acetice, larg răspândite în natură în băuturile uşor alcoolizate: must de malţ, sucuri de fructe, bere, vin. Se prezintă ca bacili de formă elipsoidală, cu capetele rotunjite, drepţi, sau uşor curbaţi, 0,5-0,8x0,9-4,2μm, izolaţi, sau grupaţi în diplo- sau lanţuri. Sunt bacterii Gram-negative, nesporulate, mobile, sau imobile, strict aerobe, unele producând pigmenţi, altele celuloză. Fiind strict aerobe se dezvoltă la suprafaţa mediilor, formând membrane subţiri, sau groase, netede, sau cutate. Caracteristica principală a acestor bacterii este capacitatea lor de a oxida etanolul rapid şi complet la acid acetic şi de a tolera o aciditate mare în mediu (2-11% acid acetic). Prin această oxidare bacteriile îşi procură energia necesară proceselor vitale.

O altă caracteristică a bacteriilor acetice este aceea că unele oxidează etanolul numai la acid acetic, acumulându-l în mediu, pe când altele, oxidează mai departe acidul acetic format, până la CO_2 şi H_2O, lucru de nedorit pentru industria oţetului. În jurul acestei caracteristici, s-au făcut de-a lungul anilor numeroase studii privind toxonomia bacteriilor acetice. În prezent, se admite existenţa a două genuri, menţionate şi în ediţia a 9-a a Manualului de sistematică bacteriană a lui Bergey şi anume: Genul *Acetobacter* şi genul *Gluconobacter*.

Genul *Acetobacter* cuprinde speciile care oxidează etanolul la acid acetic şi mai departe până la CO_2 şi H_2O. Aceste bacterii posedă enzimele ciclului Krebs, dar nu şi cele ale

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ciclului pentozofosfat. Existența enzimelor ciclului Krebs explică de altfel oxidarea mai departe a acidului acetic la CO_2 și H_2O. Ca surse de carbon folosesc lactatul; nu folosesc glucoza, decât în prezența lactatului. Cresc ușor pe mediu mineral, folosind ca sursă de azot săruri de amoniu și nu au nevoie de factori de creștere exogeni. Specia tip este: *Acetobacter aceti*. Alte specii ale acestui gen: *A. pasteurianus*, *A. hansenii*, *A. xylinum*.

Genul *Gluconobacter* cuprinde speciile care oxidează etanolul numai la acid acetic. Aceste bacterii nu posedă enzimele ciclului Krebs, dar le posedă pe cele ale ciclului pentozofosfat. Nu folosesc lactatul ca sursă de carbon, dar cresc bine pe glucoză și anumiți polioli ca: glicerină, manită, sorbită. Oxidează glucoza la acid gluconic, acid 2-cetogluconic și acid 5-cetogluconic. Cresc greu pe mediu mineral și necesită ca sursă de azot aminoacizi preformați și vitamine din grupul B ca factori de creștere. Specia tip este: *Gluconobacter oxydans* (*Acetobacter suboxydans* după denumirea mai veche).

1.2. Biochimia formării acidului acetic

Formarea acidului acetic presupune două dehidrogenări succesive (Fig. 39): într-o primă etapă are loc oxidarea etanolului la acetaldehidă, catalizată de o alcool-dehidrogenază specifică, dependentă de NAD, sau NADP.

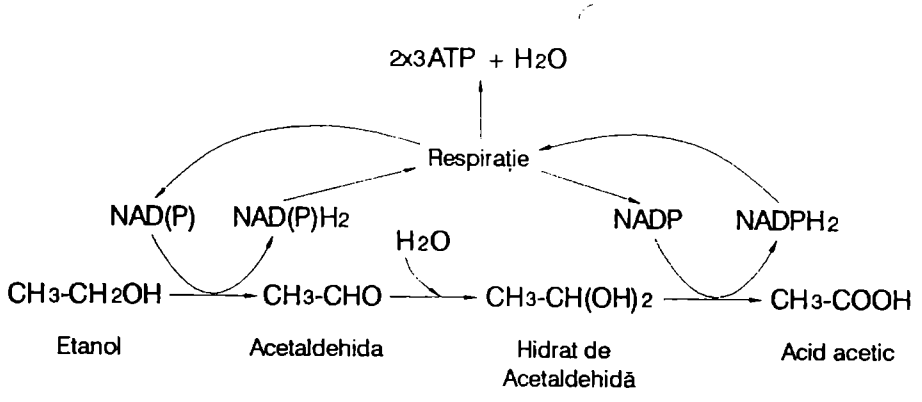


Fig. 39 – Oxidarea etanolului la acid acetic

Apoi are loc o hidratare a acetaldehidei și o a doua oxidare, în care, hidratul acetaldehidei este oxidat la acid acetic, reacție catalizată de o acetaldehid-dehidrogenază, dependentă de NADP. $NADH_2$, sau $NADPH_2$ se reoxidează prin transferul electronilor prin lanțul de citocromi, până la oxigen, care funcționează ca acceptor final de electroni. În timpul oxidării se formează 1 mol de acid acetic dintr-un mol de etanol și rezultă 6 moli de ATP pe molul de acid acetic produs.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cercetările ulterioare făcute de Nakayama au stabilit că oxidarea etanolului la acid acetic are loc într-adevăr în două trepte, cu formarea intermediară de acetaldehidă, dar enzimele participante sunt diferite de cele amintite mai înainte. Astfel, în prima etapă de oxidare la acetaldehidă, acționează o reductază care este o hem-proteină similară citocromului C şi având maximul de absorbție la 553nm.

În a doua etapă, acționează fie o aldehid-dehidrogenază independentă de coenzimă, fie o aldehid-dehidrogenază dependentă de NADP. În acest caz, schema oxidării etanolului ar fi după Nakayama următoarea: etanolul este oxidat de o etanol-citocrom 553-reductază (E_1) la aldehidă. Electronii sunt transferați la fierul din hemul enzimei E_1. Acetaldehida este apoi oxidată de o aldehid-dehidrogenază independentă de coenzimă (E_2), sau de o aldehid-dehidrogenază dependentă de NADP (E_3). În cazul oxidării de către E_2, electronii sunt transferați tot la fierul hemului enzimei E_1. Citocromul 553 redus este reoxidat de către o citocrom-oxidază prezentă în celulă. Electronii eliberați în timpul oxidării acetaldehidei de către E_3 reduc NADP la $NADPH_2$, care se reoxidează în lanțul de citocromi.

1.3. Producerera industială a acidului acetic

Oțetul este produs prin acetificarea microbiologică a diferitelor lichide fermentate alcoolic (pe bază de materii prime amidonoase, sau zaharoase): malț, vin, cidru (vin de mere), alte sucuri de fructe fermentate alcoolic. Conținutul în alcool nu trebuie să fie prea ridicat, sau prea scăzut. Oțetul cel mai bun se obține din vinul care are o concentrație de 8-9% alcool etilic.

Procedeele folosite sunt procedee de suprafață şi procedee submerse.

Prodedeele de suprafață, încă destul de larg răspândite, au la bază procedeul german. Se foloseşte un vas cilindric din lemn, numit generator, care este umput cu talaş fin din lemn de fag, la care se adaugă bacterii acetice selecționate. În generator, se asigură pe la partea inferioară, pătrunderea permanentă a unui curent de aer, iar pe la partea superioară se introduce substratul alcoolic, conținând o cantitate mică de zahăr fermentescibil. Trecând prin stratul de talaş, lichidul alcoolic este fin divizat în picături, etalat pe o suprafață mare şi bogat oxigenat, astfel încât suferă un proces de oxidare rapidă în acid acetic (Fig. 40). Pentru ca oxidarea să fie completă, acelaşi lichid este trecut de trei ori prin stratul de talaş. Temperatura de acetificare este de 28°-30°C; în aceste condiții, procesul durează 8 zile. Întrucât în timpul oxidării se degajă căldură, generatorul se răceşte sub 40°C, pentru a preveni pierderile de acid acetic prin volatilizare, sau inhibarea creşterii bacteriilor, datorită căldurii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În prezent au câştigat importanţă procedeele submerse de obţinere a oţetului. În acest caz, se folosesc vase speciale numite acetatoare, ca de exemplu acetatorul Frings, cu aerare foarte intensă, în care procesul decurge în 48h.

Dintr-o soluţie alcoolică de 10-12% se obţine până la 13% acid acetic. Oţetul proaspăt este lăsat să stea aproximativ 6 săptămâni în butoaie de lemn, conţinând aşchii din lemn de fag vechi, care permit precipitarea substanţelor coloidale, împreună cu fierul, cuprul, calciul şi fosfatul. Oţetul finit are o stabilitate coloidală bună şi şi-a pierdut mult din asprimea iniţială. El este diluat la 4-5% aciditate, filtrat şi transferat în butoaie, sau sticle.

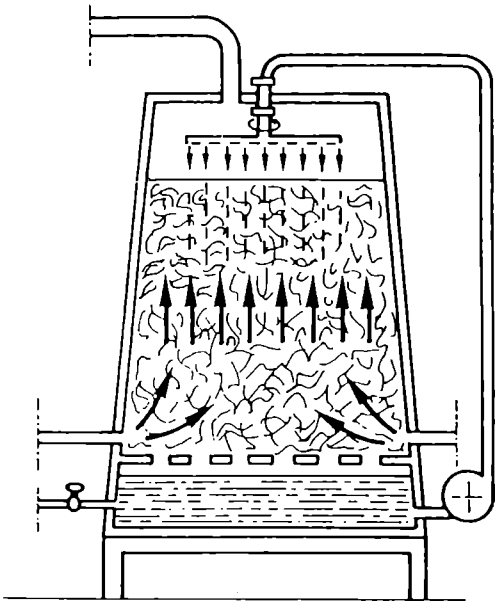


Fig. 40. Schema unui generator cu barbotare pentru producerea oţetului. Explicaţii în text.

2. Acidul gluconic

2.1. Microorganisme producătoare

Acidul D-gluconic şi δ-lactona sa sunt produşi de dehidrogenare ai D-glucozei. Producerea lor de către microorganisme e realizată de către bacterii acetice (g. *Acetobacter* şi g. *Gluconobacter*) şi de către mucegaiuri (g. *Aspergillus* şi g. *Penicillium*). Iniţial (1927) s-a folosit pentru producţia industrială *Penicillium luteumpurpurogenum* obţinându-se un randament de 60%. Deoarece folosirea speciilor de *Penicillium* implică unele greutăţi, în special în ceea ce priveşte obţinerea unei cantităţi suficiente de conidii pentru inoculare, s-au

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

preferat speciile de *Aspergillus,* în special specia *Aspergillus niger,* cu care s-au obținut randamente de 95% în 24 de ore; această specie este folosită și în prezent în producția industrială de acid gluconic.

2.2. Biochimia producerii acidului gluconic

Conversia glucozei la acid gluconic implică oxidarea acesteia fără fosforilare, oxidare realizată de enzima glucozoxidaza existentă la *Aspergillus sp.*și *Penicillum sp.* (Cap.VI). Enzima este o dehidrogenază, care utilizează oxigenul molecular ca acceptor de hidrogen, formând H_2O_2, care este apoi descompusă de catalaza fungică în apă și oxigen. În această oxidare se consumă un mol de oxigen pentru un mol de glucoză. Ca intermediar se formează δ-gluconolactona, care prin hidroliză spontană trece în acid gluconic (Fig.41).

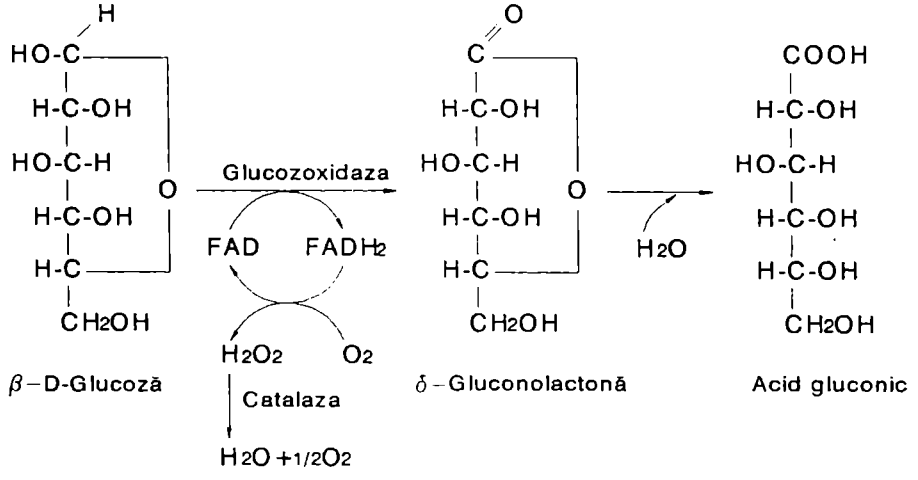


Fig. 41 – Oxidarea glucozei la acid gluconic

Glucozoxidaza este o flavoproteină, având ca grupare prostetică FAD și este înalt specifică, deoarece oxidează numai β-D-glucoza (Cap. VI). Se cunosc puține lucruri în legătură cu reglarea sintezei glucozoxidazei și formarea acidului gluconic. Se pare că există o relație cantitativă între formarea enzimei, respectiv cantitatea de glucozoxidază și producția de acid gluconic. Aparent, sinteza enzimei este indusă de glucoza din mediu și de concentrații ridicate de oxigen. Totuși, rolul fiziologic al glucozoxidazei în formarea acidului gluconic rămâne încă neclar. Faptul că glucozoxidaza este localizată în peroxizomi pune problema unui rol în transferul intracelular de hidrogen, sau electroni.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2.3. Producerea industrială

Ceea ce caracterizează producerea de acid gluconic este faptul că nu depinde de creşterea microorganismului, ci de prezența enzimei specifice, glucozoxidaza. Din acest motiv, miceliul odată format, pote fi folosit de mai multe ori pentru oxidarea unor soluții de glucoză mai concentrate.

Valoarea pH a mediului este de asemenea importantă, ea trebuind să fie menținută la valoarea 6,5. Aceasta se realizează prin adăugarea de $CaCO_3$, care neutralizează acidul gluconic format, rezultând gluconat de calciu. Deoarece precipitarea gluconatului de calciu poate întârzia producerea de acid gluconic şi deci, folosirea mediilor cu concentrații mari de zahăr, aceasta poate fi înlăturată prin adăugarea în mediu a unei mici cantități de bor, ca borax, sau acid boric, care previne precipitarea gluconatului de calciu.

Procedeul de cultivare folosit în prezent este cu precădere cel submers care dă randamente mai mari, o durată a procesului mai mică şi posibilitatea refolosirii miceliului de mai multe ori.

Pentru a evita precipitarea gluconatului de calciu concentrația de glucoză a mediului nu trebuie să depăşească 15g%. Carbonatul de calciu se sterilizează separat şi se adaugă mediului steril. În aceste condiții, la o temperatură de 30°C, oxidarea glucozei are loc în 10h. Dacă se folosesc concentrații de glucoză mai ridicate, mergând până la 30-35%, trebuie adăugat un exces de $CaCO_3$ şi o cantitate de 150 p.p.m. acid boric, sau borax, care previne precipitarea gluconatului de calciu, prin formarea borogluconatului de calciu solubil. Totuşi, deoarece borogluconatul este nociv pentru vasele de sânge ale mamiferelor se preferă evitarea acestui procedeu.

Pentru obținerea gluconatului de sodiu neutralizarea la pH= 6,0-6,5 se face cu NaOH, treptat, pe măsura formării acidului gluconic. Concentrația de glucoză din mediu este cuprinsă între 24 şi 35%, fără primejdia precipitării gluconatului de sodiu, iar randamentul este de 95%. Este de menționat faptul că producerea acidului gluconic nu ridică probleme de contaminare, deoarece procedeul decurge foarte rapid, încât contaminanții nu au timp să se dezvolte şi în plus, mediul nu este adecvat pentru multe microorganisme. Reutilizarea miceliului filtrat, ridică totuşi probleme de contaminare cu bacterii sau alți fungi. S-a constatat totuşi, lipsa contaminării, în cazul refolosirii miceliului de 4 ori.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. 3. Utilizările acidului gluconic

Acidul gluconic are largi utilizări în industria farmaceutică, unde este folosit ca vehicul pentru administrarea de metale. Astfel, gluconatul de calciu este folosit ca sursă terapeutică de calciu pentru copii şi femei gravide, deoarece combină avantajul unei mari solubilități cu cel al unei largi toleranțe fiziologice. În mod similar, gluconatul de fier şi fosfogluconatul de fier sunt folosiți în tratamentul anemiilor nutriționale.

Gluconatul de sodiu se foloseşte ca agent de sechestrare față de ionii metalici, ca de exemplu: Ca^{2+}, Mg^{2+}, în mediu alcalin şi Fe^{2+}, la toate valorile de pH. Acțiunea de sechestrare se datoreşte formării de chelate cu aceste metale.

Gluconatul de sodiu se mai foloseşte la laminarea metalelor, la tăbăcirea pieilor, la mordansarea țesăturilor şi în vopsitorie.

Lactona acidului gluconic este folosită drept catalizator acid în producția de răşini sintetice, sau în industria alimentară, ca de exemplu la obținerea prafurilor de copt, sau la pregătirea cârnaților.

3. Transformări ale steroizilor şi sterolilor

Steroizii naturali aparțin la trei categorii:

- steroli (colesterol, ergosterol, sitosterol, stigmasterol);
- acizi biliari (acid dezoxicolic);
- hormoni, aceştia la rândul lor , aparținând la patru categorii:
  - hormoni androgeni (testosteron, androstendion);
  - hormoni estrogeni (estronă sau foliculină, estradiol);
  - hormoni progestivi, implicați în sarcină (progesteron);
  - hormoni corticali, produşi de cortexul suprarenalei (cortizon, hidrocortizon).

Fără îndoială că unul din cele mai interesante domenii ale microbiologiei industriale este rolul microorganismelor în sinteza unor steroizi de importanță terapeutică, cum sunt hormonii corticosteroizi (corticali), folosiți în tratamentul bolilor reumatismale, inflamațiilor şi alergiilor. Efectele biologice specifice sunt determinate de anumite caracteristici din structura moleculei de steroid.

Cercetările în acest domeniu au început în 1952, când Peterson a descoperit că se putea produce 11α-hidroxiprogesteron, pe cale microbiologică, plecând de la progesteron. Ce a însemnat această descoperire ne dăm seama din faptul că în aceeaşi perioadă, s-a făcut sinteza chimică a cortizonului, plecând de la acid dezoxicolic, furnizat de bilă şi că, pentru

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

această sinteză au fost necesare 32 de etape exclusiv chimice, totalizând 2 ani de muncă, cu un randament final de 0,15%.

În ceea ce priveşte capacitatea microorganismelor de a produce transformări ale steroizilor, nu este clar încă pe ce căi produc microorganismele aceste transformări şi care parte a acestor reacţii joacă rol în metabolismul general al celulei microbiene. Foarte puţine microorganisme necesită surse exogene de steroizi pentru creştere; totuşi, majoritatea fungilor (drojdii şi mucegaiuri) conţin steroizi (ergosterol). Foarte puţin se ştie şi despre enzimele responsabile de aceste transformări microbiene de steroizi, deşi, unele dintre acestea au fost studiate. Este clar că aceste enzime nu sunt constitutive, ci induse de prezenţa unui substrat corespunzător.

3.1. Structură

Steroizii sunt compuşi organici care au la bază hidrocarbura **ciclopentano-perhidrofenantren**, sau **steran** (fig.42). Este formată din trei inele asemănătoare fenantrenului, însă în formă redusă (perhidro), la care se adaugă un inel ciclopentanic. La atomii de carbon din poziţiile 13 şi 10 toţi steroizii posedă câte o grupare metil (C_{18} şi respectiv C_{19}). Majoritatea au o dublă legătură între C_4 şi C_5 notată cu Δ_4. Excepţie fac hormonii estrogeni (estrona şi estradiolul), la care lipseşte gruparea metil de la C_{10} (C_{19}), iar nucleul A este aromatic (Fig. 42). Atomii de H ai scheletului carbonic pot fi înlocuiţi cu diferiţi substituenţi, cei mai importanţi fiind grupările –OH. Aceştia pot intra în poziţia α sau **trans** (sub planul moleculei) şi se notează cu linie punctată (...), sau în poziţia β sau **cis** (deasupra planului moleculei) şi se notează cu linie plină (—) (Fig. 42). Structura catenei laterale de la C_{17} poate varia, sau poate lipsi complet ca la hormonii androgeni şi estrogeni.

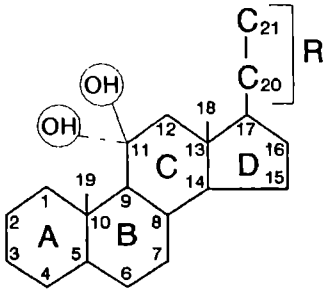


Fig. 42 – Structura de bază a steroizilor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3.2. Transformări ale steroizilor produse de microorganisme

Microorganismele pot realiza următoarele transformări ale steroizilor:

- Hidroxilarea în poziția 11, realizată de fungi şi în poziția 16, realizată de *Streptomyces sp.*

- Dehidrogenarea nucleului A în pozițiile 1 şi 2 realizată de bacterii: *Corynebacterium (Arthrobacter) simplex*, *Mycobacterium sp.*, *Nocardia sp.* şi de unii fungi

- Ruperea catenei laterale din poziția 17, realizată de fungi.

Microorganismele pot realiza şi alte tipuri de transformări, dar cele enumerate mai înainte sunt cele mai importante, care interesează microbiologia industrială.

Hidroxilarea în poziția 11α a fost realizată pentru obținerea de 11α-hidroxi-progesteronă, pornind de la progesteronă, cu culturi de *Rhizopus nigricans* (Fig.43). Substanța obținută serveşte ca materie primă pentru sinteza cortizonului, hidrocortizonului (cortizolului) şi altor steroizi.

Se foloseşte o suspensie de spori de *R. nigricans* cu care se însămânțează un mediu de cultură ce conține glucoză ca sursă de carbon şi *corn-steep* ca sursă de azot; valoarea pH se menține la 5,0 prin ajustare cu NaOH; cultivarea se face în condiții de aerare şi agitare. Progesterona dizolvată în acetonă se adaugă la 19h de la începutul procesului, care durează în total 48h; produsul obținut se extrage cu clorură de metilen.

Hidroxilarea în poziția 11β a fost realizată pentru obținerea de hidrocortizon (cortizol), plecând de la cortexolon (substanța S a lui Reichstein), folosind tot fungi şi anume: *Curvularia lunata* sau *Curvularia blakesleeana* (Fig.44). Cortizolul este transformat apoi în cortizon pe cale chimică.

Hidroxilarea în poziția 16α este o altă hidroxilare importantă pentru obținerea unui analog sintetic al steroizilor corticali. Astfel, pornind de la 9α-fluorocortizol se poate obține 9α-fluoro-16α-hidrocortizol folosind bacterii şi anume: *Streptomyces roseochromogenes* (Fig.45)

În toate hidroxilările, oxigenul din –OH provine din oxigenul atmosferic şi nu din apă. Gruparea hidroxil are aceeaşi configurație (α sau β) cu a hidrogenului care a fost înlocuit. Enzimele care realizează acest proces sunt monooxigenaze înalt specifice şi sunt enzime induse de substratul precursor. Majoritatea necesită $NADPH_2$ şi în sistemul transportor de electroni de la $NADPH_2$ la O_2 s-au mai pus în evidență o proteină cu fier nehemic asemănătoare ferredoxinei, o flavoproteină şi citocromul P-450.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

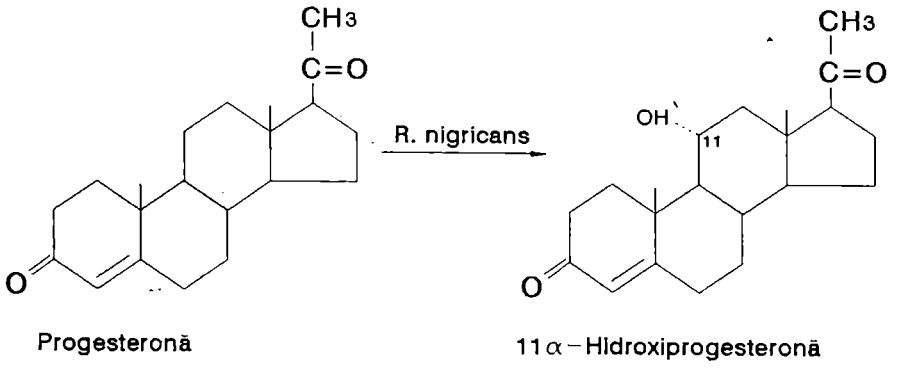


Fig. 43 – Hidroxilare în poziţia 11α

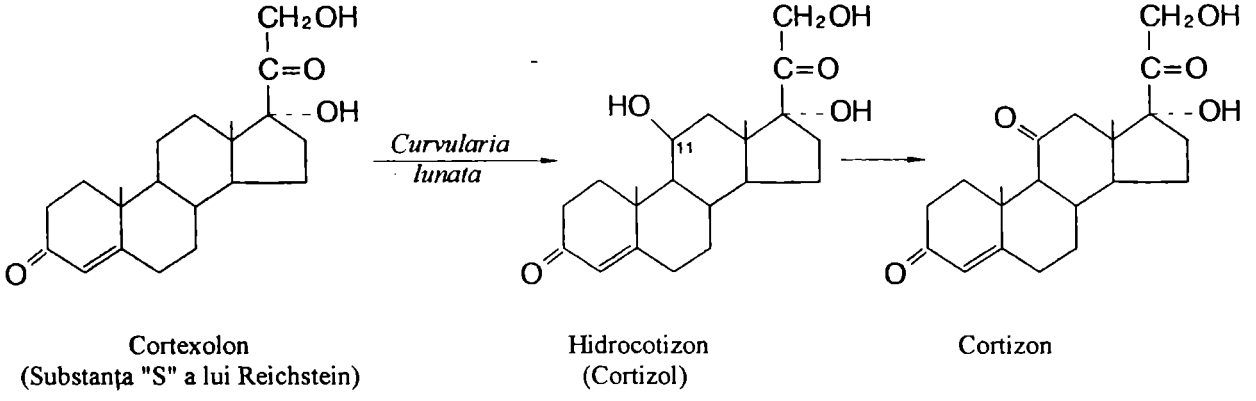


Fig. 44 – Hidroxilare în poziţia 11β cu formare de hidrocortizon

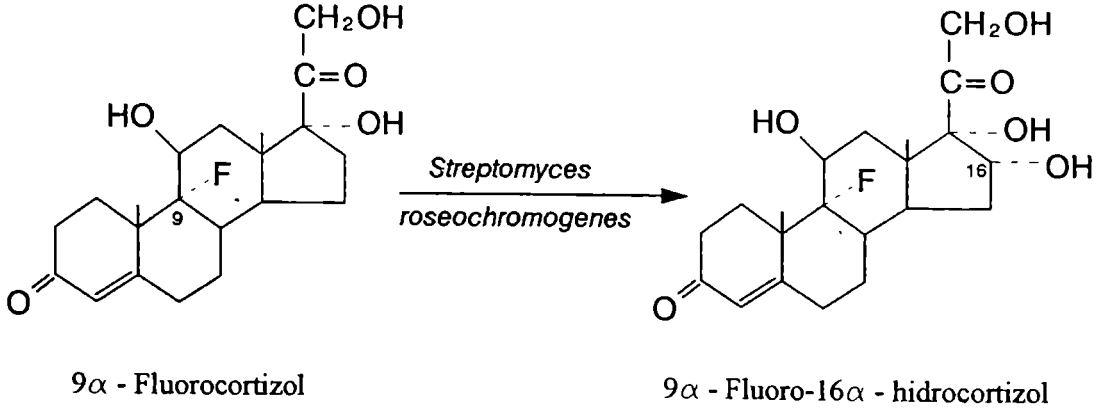


Fig. 45 – Hidroxilare în poziţia 16 α

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Dehidrogenarea nucleului A

Steroizii cu cea mai marcată acțiune antiinflamatoare sunt nesaturați în poziția 1-2, ca de exemplu prednizon, prednizolon, triamcinolon. Dehidrogenarea nucleului A în poziția 1-2 poate fi realizată fără ruperea catenei laterale din poziția17, sau cu ruperea acesteia.

- Dehidrogenarea fără ruperea catenei laterale a dus la obținerea de prednizon plecând de la cortizon (Fig.46), sau de prednizolon, plecând de la cortizol. Transformarea este realizată de bacterii ca: *Arthrobacter simplex, Mycobacterium sp., Nocardia sp..*

Mediul de cultură, conținând glucoză, peptonă şi *corn-steep* şi tamponat la pH =7,0 este însămânțat cu *Arthrobacter (Corynebacterium) simplex.* După 24h de creştere se adaugă substratul precursor (cortizon, sau cortizol) fin pulverizat. Randamentele sunt extrem de mari. Astfel, pentru 1g cortizol adăugat la 100ml cultură se obține în 24h 0,985g prednizolon brut.

Dehidrogenarea cu ruperea catenei laterale duce la obținerea de derivați ai androstanului, plecând de la progesteron, transformare realizată de fungi. Astfel, de la progesteronă se poate obține Δ1,4-androstendion cu *Fusarium solani,* sau *Fusarium flavanicum* (Fig.47). Substanța astfel obținută poate fi convertită pe cale chimică în steroizi cu nucleul A aromatic ca estrona şi estradiolul.

- Dehidrogenazele 1-2 nu necesită oxigen şi ca acceptori de hidrogen pot folosi: fenazin-metosulfat, resazurină, sau 2-6-diclorfenol indofenol.

Ruperea catenei laterale din poziția 17

Această transformare are loc fără dehidrogenarea în poziția 1-2 şi este realizată de mucegaiuri din genul *Penicillium: P. chrysogenum,* sau *Aspergillus: A. flavus.* De exemplu, plecând de la progesteronă, prin ruperea catenei laterale din poziția 17 se pot obține hormoni androgeni: testosteron şi androstendion (fig.48).

În legătură cu această transformare, trebuie menționat şi faptul că unele bacterii, cum sunt cele din genul *Mycobacterium* şi *Nocardia* sunt capabile să rupă catena laterală din poziția 17 pornind de la steroli cum sunt colesterolul şi sterolii din plante: sitosterolul şi stigmasterolul. Aceştia sunt steroli cu 27-29 atomi de carbon, iar catena laterală din poziția 17 conține 8-10 atomi de carbon. Prin ruperea acestei catene rezultă steroizi cu 19 atomi de carbon de tipul hormonilor androgeni. De exemplu, *Mycobacterium sp.* realizează această transformare pornind de la colesterol, sau sitosterol cu formare de androstendion.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

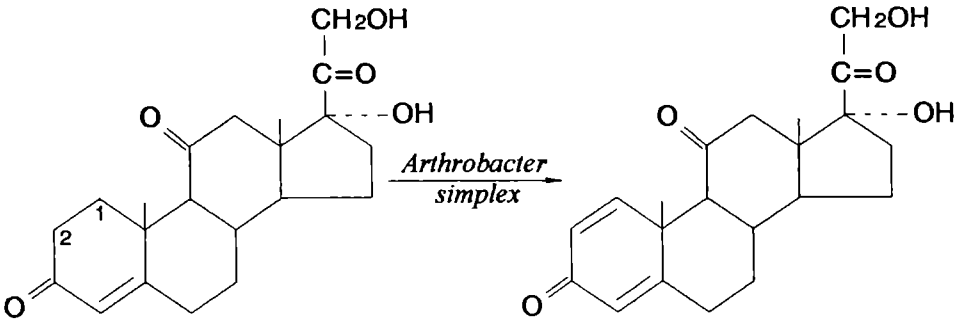


Fig. 46 – Dehidrogenare în poziția 1-2 cu formare de prednizon

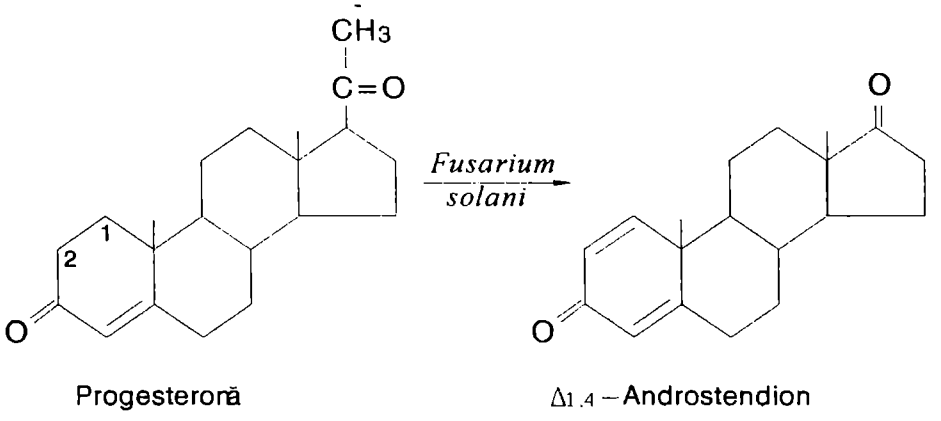


Fig. 47 – Dehidrogenare cu ruperea catenei laterale

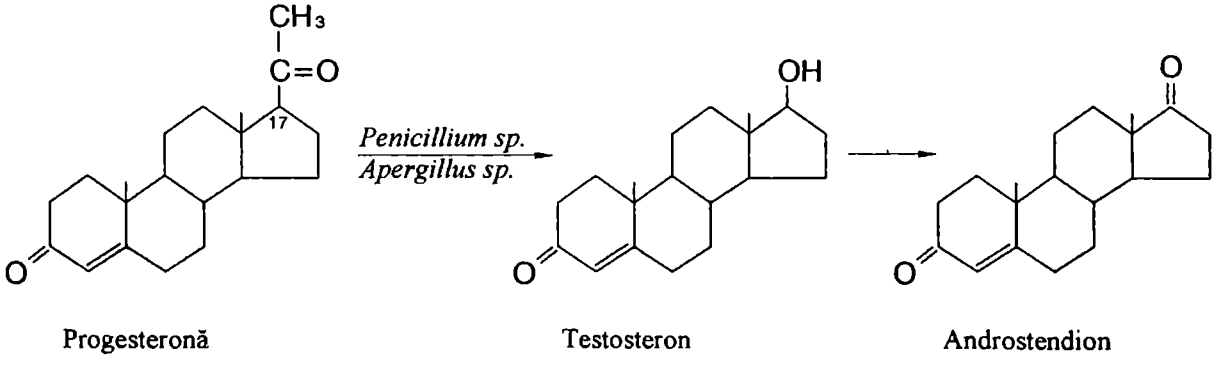


Fig. 48 – Ruperea catenei laterale din poziția 17

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Industrial, toate transformările microbiene ale steroizilor au fost realizate în condiții de cultivare discontinuă. În prezent, s-au făcut progrese în acest domeniu, prin folosirea celulelor microbiene imobilizate. Avantajele acestui procedeu sunt: reducerea riscului de contaminare, o durată mai scurtă a procesului, posibilitatea creşterii concentrației substratului precursor şi simplificarea operațiilor de extragere a produsului final. Întrucât majoritatea steroizilor care servesc ca substrat precursor nu sunt foarte solubili, s-au dezvoltat condiții de transformare într-un sistem de solvenți, care nu este miscibil cu apa.

4. Transformări ale compuşilor nesteroidici: acidul L-ascorbic (Vitamina C)

În afara produşilor steroidici, microorganismele pot produce transformări şi ale altor compuşi, dintre care, de importanță industrială este producerea acidului L-ascorbic sau vitamina C. Producerea acestei vitamine se face exclusiv pe cale chimică, dar există o etapă în acest proces, care nu se pote face decât pe cale microbiologică şi anume: oxidarea D-sorbitolului la L-sorboză. Această oxidare este realizată de bacterii acetice ca: *Gluconobacter oxidans, Acetobacter xylinum,* care posedă enzima sorbitol-dehidrogenaza, care realizează această oxidare.

Se porneşte de la glucoză, care este redusă chimic la D-sorbitol; acesta este apoi oxidat de bacteriile acetice la L-sorboză (Fig. 49), care mai departe, pe cale chimică, este transformată în acid L-ascorbic (vitamina C). Cultivarea se face submers, la 30-35°C sub aerare şi agitare puternică. Sorbitolul se adaugă într-o concentrație inițială de 20% la o soluție nutritivă conținând 0,5g% extract de drojdie, sau *corn-steep* şi $CaCO_3$. În aceste condiții, conversia este completă după aproximativ 24h. În prezent există procedee care folosesc pentru această oxidare celule bacteriene imobilizate pe poliacrilamidă.

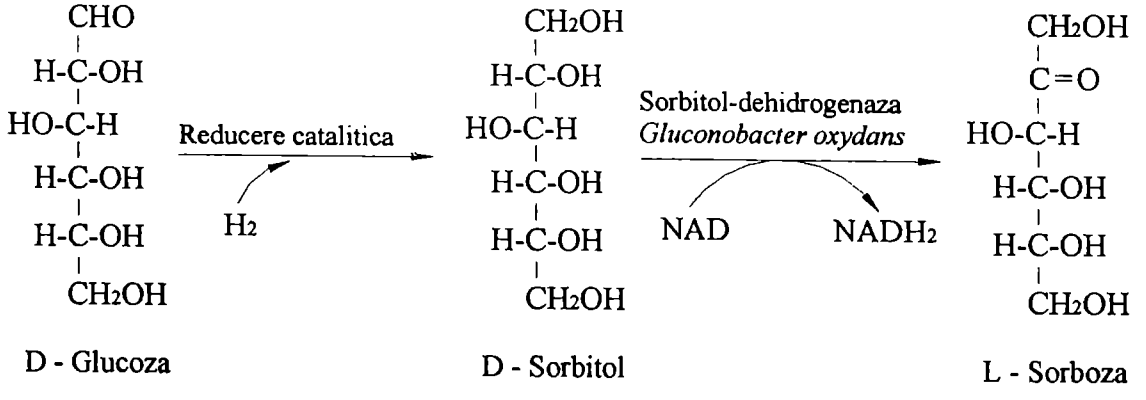


Fig. 49 – Oxidarea D-sorbitolului la L-sorboză în producția vitaminei C

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CAPITOLUL VIII

POLIZAHARIDE EXTRACELULARE MICROBIENE

Polizaharidele sunt utilizate comercial pentru producerea de geluri si pentru îngrosarea si stabilizarea alimentelor, medicamentelor si produselor industriale. Sunt utilizate de asemenea ca polimeri în procesele de recuperare terțiară a țițeiului din zăcămintele uzate. Deşi polizaharidele de origine vegetală ca amidonul, sau agarul sunt folosite de mulți ani, polizaharidele microbiene au început să fie folosite abia după anul 1960. Din cauza costurilor de producție, numai polizaharidele microbiene extracelulare sunt la ora actuală de importanță comercială.

1. Microorganisme producătoare şi clasificare

Microorganismele producătoare sunt bacteriile şi fungii microscopici, respectiv mucegaiurile. Bacteriile producătoare aparțin genurilor: *Xanthomonas, Pseudomonas, Azotobacter, Alcaligenes, Leuconostoc*; mucegaiurile producătoare aparțin genurilor: *Sclerotium, Aureobasidium*.

Polizaharidele microbiene utilizabile sunt de două categorii: **neutre** şi **anionice**.

Polizaharidele neutre sunt: dextranul şi curdlanul produse de bacterii; scleroglucanul şi pullulanul produse de mucegaiuri. Polizaharidele anionice sunt: alginatul şi xantanul produse de bacterii.

În Tabelul 10 sunt date principalele polizaharide microbiene de importanță comercială şi microorganismele producătoare.

O altă clasificare a polizaharidelor microbiene ține cont de structura lor chimică şi din acest punct de vedere se împart de asemenea în două categorii: **homopolizaharide**, care conțin un singur glucid şi **heteropolizaharide**, care conțin mai multe tipuri de glucide şi chiar substanțe neglucidice. În categoria homopolizaharidelor intră: dextranul, curdlanul, pullulanul şi scleroglucanul, iar în categoria heteropolizaharidelor intră xantanul şi alginatul.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2. Biosinteza

Biosinteza heteropolizaharidelor este comparabilă cu cea a componentelor peretelui celular bacterian. Pornind de la glucoză se formează pe calea glucozo-fosfatului un nucleotid specific, urmată de transformarea glucozei în alt glucid.

Tabelul 10. Polizaharidele microbiene de importanță comercială

Polizaharid	Tipul	Microorganism producător
Dextran	neutru homopolizaharid	*Leuconostoc mesenteroides* *Leuconostoc dextranicum* *Streptococcus mutans*
Curdlan	neutru homopolizaharid	*Alcaligenes faecalis*
Scleroglucan	neutru homopolizaharid	*Sclerotium glucanicum* *Sclerotium delphinii* *Sclerotium rolfsii*
Pullulan	neutru homopolizaharid	*Aureobasidium (Pullularia) pullulans*
Alginat	anionic heteropolizaharid	*Pseudomonas aeruginosa* *Azotobacter vinelandii*
Xantan	anionic heteropolizaharid	*Xanthomonas campestris*

La nivelul nucleotidului glucidic au loc următoarele transformări, adică GDP-manoză şi GDP-acid manuronic. Transportul monozaharidelor prin membrană în·interiorul şi în afara celulei are loc după cuplarea la un alcool izoprenoid fosfat cu C_{55}.

Spre deosebire de heteropolizaharide, biosinteza homopolizaharidelor (ca de exemplu, dextranul) are loc extracelular, prin transferul unui singur monozaharid, de la un donor, către capătul nereducător al unui lanț polizaharidic.

3. Principalele polizaharide microbiene de importanță comercială

3.1 Homopolizaharide

Dextranul este unul dintre primele polizaharide microbiene cunoscute şi utilizate în practică. Denumirea corectă ar fi dextrani, deoarece reprezintă un grup complex, cu greutate

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

moleculară cuprinsă între 15.000 şi 500.000 daltoni. Este un α–D-glucan, în care legăturile între unitățile de glucoză sunt 1-6 glicozidice pentru majoritatea dextranilor, dar există şi dextrani care pot avea legături 1-2, 1-3 sau 1-4 glicozidice.

Dextranul este produs de enzima **dextransucraza**, o transglucozidază extracelulară, care acționează asupra zaharozei eliberând fructoză liberă şi transferând restul de glucoză la o moleculă de acceptor, de regulă un lanț polizaharidic, care este de asemenea legat de enzimă:

$(1\text{-}6\text{-}\alpha\text{-D-glucozil})_n$ + zaharoză $\rightarrow$ $(1\text{-}6\alpha\text{-D-glucozil})_{n+1}$ + fructoză

În timpul polimerizării lanțul de dextran care creşte rămâne legat de enzimă, gradul de polimerizare avansând până când o moleculă acceptor (în cel mai simplu caz acesta este o moleculă de substrat) eliberează lanțul polimeric de enzimă. Glucidele cu grad mic de polimerizare nu sunt eficiente ca molecule acceptor, afinitatea enzimei crescând cu lungimea lanțului. Dextransucraza este produsă de o serie de bacterii lactice, printre care, în primul rând, *Leuconostoc mesenteroides*, precum şi de unii streptococi, ca de exemplu, *Streptococcus mutans*, care joacă rol în formarea cariilor dentare. Producția industrială de dextran se realizează cu *Leuconostoc mesenteroides* care formează un polimer cu o greutate moleculară de $4\text{-}5\text{x}10^7$ daltoni şi având 95% legături 1-6-glicozidice, iar restul, 1-3-glicozidice.

Dextranii sunt utilizați în scopuri farmaceutice ca înlocuitori de plasmă. Pentru a fi utilizați în acest scop, dextranii respectivi trebuie să aibă o greutate moleculară mai mică, de ordinul 75.000 ± 25.000 de daltoni. Soluțiile conținând 6% din aceşti dextrani au valori de vâscozitate şi comportare coloid-osmotică similare cu cele ale plasmei sanguine umane.

Dextranii cu greutate moleculară mai mică decât cea amintită nu au valoare terapeutică, deoarece sunt eliminați prea repede din circulația sanguină, iar cei cu greutate moleculară mai mare interferă cu coagularea sângelui.

Deoarece dextranii nu sunt degradați de amilaze în corpul uman, posibilitatea unei afectări a ficatului este mai mică decât în cazul altor substituenți de plasmă. Dextranii se resorb foarte bine de către țesuturi şi pot fi utilizați în aplicarea unor substante, ca de exemplu fierul, în tratamentul anemiilor.

Producerea industrială a dextranului se face intr-un mediu de cultură conținând săruri minerale, 2% *corn-steep*, zaharoză, fier şi mangan în urme. După însămânțare, la temperatura de 25C, se observă mai intâi scăderea valorii pH de la 6,4 – 7,0 la 4,0 datorită formării acidului lactic. Sub agitare şi aerare continuă, după 3-4 zile se formează dextranul ca o masă gelatinoasă. Alături de dextran se mai află fructoză liberă, acid lactic şi etanol. Prin precipitate cu metanol se obține dextranul brut cu o greutate moleculară de 500.000 daltoni.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pentru obținerea dextranului terapeutic, cu greutate moleculară mai mică (50.000 – 100.000 daltoni), dextranul brut este supus hidrolizei cu acid clorhidric la 100° – 105°C, fracționat prin precipitare cu metanol şi uscat.

Deoarece hidroliza acidă este dificil de controlat şi fractiunile obținute adesea nu au greutatea moleculară dorită se preferă sinteza directă a dextranilor terapeutici. Pentru aceasta trebuie ținut cont de faptul că greutatea moleculară este influențată de: a) concentrația de zaharoză; b) lanțul de glucoză ce funcționează ca acceptor; c) temperatura de reacție. S-a observat de exemplu că folosirea unor dextrani cu greutate moleculară mică, care funcționează ca acceptori este foarte indicată. Astfel, într-un amestec ce conține ca acceptor 2g% dextran cu greutate moleculară de 10.000 – 25.000 daltoni şi zaharoză 10g%, la temperatura de 15°C şi pH=5,0 se obține un produs din care 50% are greutatea moleculară dorită (50.000 – 100.000 daltoni) şi care poate fi folosit în clinică, fără să mai fie nevoie de hidroliză.

În prezent producția mondială de dextran depăşeşte 2000 tone.

Curdlanul este un polimer de glucoză în care legăturile sunt β-1-3-glicozidice, deci este un β-1-3-glucan. Este produs de bacteria *Alcaligenes faecalis var. myxogenes*. Această bacterie produce pe lângă curdlan, care este un homopolizaharid şi succinoglucan, un heteropolizaharid, care conține glucoză, aproximativ 10% acid succinic şi galactoză. Donorul de glucoză este probabil UDP (uridin-difosfat). Pentru a obține în exclusivitate curdlan s-a recurs la mutageneză; s-a observat că mutantele obținute de la *Alcaligenes faecalis var. myxogenes* produceau numai curdlan, față de tulpinile sălbatice care produceau şi succinoglucan.

Deşi insolubil în apă rece, curdlanul formează un gel stabil prin încălzire peste 54°C. Rezistența gelului depinde de temperatura folosită, ea crescând între 80°C şi 100°C. Proprietățile generale ale gelului de curdlan sunt intermediare între cele ale gelatinei (un gel elastic) şi cele ale agarului (un gel fragil). Ele pot fi folosite la o serie de alimente sau ca suport de imobilizare a enzimelor sau ca agent de legare.

Scleroglucanul este un polimer de glucoză în care legăturile principale sunt β1-3-glicozidice şi din loc în loc ramificații β1-6 glicozidice. Este produs de mucegaiuri din genul *Sclerotium* şi anume: *Sclerotium glucanicum, S. delphinii, S. rolfsii*, care cresc pe substraturi lignocelulozice hidrolizate. Greutatea moleculară a polimerului variază în limite foarte largi, de la aproximativ 110 la 1600 daltoni, cu o valoare de 800 daltoni pentru produsul comercial.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Producția de scleroglucan se realizează cu *S. rolfsii* pe un mediu cu glucoză şi cu limitarea nitratului.

Diferitele utilizări ale scleroglucanului se bazează pe vâscozitatea sa mare în soluție şi pe stabilitatea sa la temperaturi ridicate, într-un domeniu larg de valori de pH şi în prezența electroliților. Soluțiile sunt pseudoplastice şi ca urmare poate fi utilizat ca agent de suspendare, gelificare sau de acoperire; exista de asemenea, posibilități de utilizări industriale sau farmaceutice.

Pullulanul este un polimer de glucoză, în care legăturile sunt 1-4α–glicozidice în principal, unitătile de structură fiind maltotrioza şi maltotetroza, cuplate cu puține legături 1-6-α-glicozidice. Este produs de mucegaiul *Aureobasidium (Pullularia) pullulans*. Deşi rezistent la hidroliza produsă de amilaze, există o enzimă specifică, pullulanaza, produsa de bacteria *Enterobacter aerogenes*, capabilă să hidrolizeze legăturile 1-6α –glicozidice (cap. VI).

Utilizarea principală a pullulanului este capacitatea sa de a forma filme (membrane). Filmele formate prin aplicarea unei soluții de 5 – 20% polizaharid pe o suprafață netedă au o permeabilitate mică față de oxigen, comparativ cu alte materiale utilizate precum celofanul sau polipropilena.

3.2 Heteropolizaharide

Alginatul este un co-polimer de doi acizi uronici, acid D-manuronic şi acid L-galuronic, în proportie de 4:1 până la 20:1 şi legați prin legături 1-4 –glicozidice. Este produs de bacterii ca: *Azotobacter vinelandii* şi *Pseudomonas aeruginosa*. Alginatul bacterian diferă de alginatul produs de algele marine prin prezența grupărilor O-acetil, care sunt asociate numai acidului D-manuronic. Producția de alginat se realizează cu *Azotobacter vinelandii*, prin limitarea sursei de carbon sau de azot din mediu. Studii făcute din acest punct de vedere, au arătat că formarea de alginat este favorizată mai ales prin limitarea sursei de azot. Alginatul are numeroase utilizări în industria alimentară, precum şi în alte industrii nealimentare.

Xantanul este un polimer în care unitatea de bază care se repetă este un pentazaharid conținând glucoză, manoză, acid glucuronic, acetat şi piruvat. Tipul legăturilor glicozidice variază: predomină legăturile β1-4, dar se întâlnesc şi legături 1-3α şi 1-2β. Numărul unităților de piruvat din moleculă şi greutatea moleculara determină vâscozitatea xantanului. Este produs de bacterii din genul *Xanthomonas*, în special *Xanthomonas campestris*, gen

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

înrudit cu *Pseudomonas*. Comercial, este cunoscut sub diferite nume în funcție de firma producătoare, ca de exemplu: *Keltrol* si *Kelzan* (Kelco Inc., San Diego, U.S.A.), *Rhodogel* (Rhone Poulenc S.A. Melle, France). Xantanul formează soluții apoase cu vâscozitate mare şi pseudoplasticitate ridicată. Soluțiile sunt foarte rezistente la degradare la temperaturi ridicate, rezistența fiind mărită în prezența sărurilor, ca de exemplu KCl. Vâscozitatea nu este afectată de pH între valorile de 6,0 şi 9,0 şi soluțiile sunt compatibile cu concentratii mari de săruri. Greutatea moleculară variază între $2x10^6$ şi $15x10^6$ daltoni, datorită variațiilor inter- şi intramoleculare din soluție.

Dintre toate polizaharidele microbiene, xantanul, datorită proprietăților sale deosebite, are cele mai multe utilizări în diverse domenii: industria alimentară, nealimentara si petroliferă.

Producția industrială a xantanului se face într-un mediu nutritiv conținând 2-4% glucide (glucoză, zaharoză, hidrolizat de amidon), 0,05 –0,1% sursă de azot (extract de drojdie, peptonă, azotat de amoniu, sau uree) şi săruri minerale, la un pH=7,0. În timp de 2 zile, în cultură discontinuă, are loc creşterea vâscozității, care începe din faza logaritmică de creştere a culturii bacteriene şi continuă şi în faza staționară. Randamentul de xantan este de 20 – 30g/l şi reprezintă 70 – 80% din greutatea glucidelor utilizate. Izolarea din mediu se face prin precipitare cu izopropanol sau metanol, operație care omoară şi cultura microbiană. Xantanul precipitat este apoi uscat şi măcinat.

4. Utilizările exopolizaharidelor microbiene

Cu excepția dextranului, folosit în scopuri farmaceutice, dintre celelalte polizaharide microbiene, cele mai multe utilizări le au, la ora actuală xantanul şi alginatul.

4.1 Industria alimentară

Deşi amidonul este polizaharidul cel mai larg utilizat în produsele alimentare şi alte polizaharide pot fi incorporate, datorită rolului lor ca agenți de îngroşare, pentru formarea de geluri sau datorita proprietăților lor coloidale (Tabelul 11). În produse alimentare care sunt înghețate sau dezghetate, polizaharidele sunt încorporate pentru controlul formării cristalelor de gheață.

Când sunt incorporate în produse alimentare, polizaharidele trebuie să fie compatibile cu sărurile, valoarea pH şi, alte componente care se găsesc în mod natural în alimente.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel 11. Utilizarea polizaharidelor în industria alimentară.

Proprietăți	Tipuri de alimente
1. Agenți de îngroșare	- sosuri și siropuri
2. Agenți de gelificare	- deserturi bazate pe lapte, la prepararea jeleurilor, pateurilor și umpluturilor prăjiturilor din aluat
3. Coloizi	- stabilizatori în înghețată, în asezonarea salatelor și băuturilor din fructe
4. Formarea sinergică de gel	- geluri sintetice de carne
5.. Întârzierea apariției de cristale de gheață sau zahăr	- înghețată
6. Stabilitatea la pH scăzut	- asezonarea salatelor

Din acest punct de vedere, xantanul este cel mai satisfăcător, având o bună stabilitate la îngheț și dezgheț. Tipurile de alimente în care poate fi incorporat xantanul se întinde de la asezonarea salatelor, sosurilor și siropurilor la alimente conservate, alimente înghețate, etc., dar poate include la concentrații mici și sucuri de fructe, precum și alte băuturi. În acest ultim caz, rolul polizaharidelor este de a menține în suspensie pulpa fructului, precum și spuma la suprafața lichidului.

Alginații sunt de asemenea larg folosiți în alimente ca produse lactate sau deserturi înghețate. Adăugarea alginaților la iaurt, de exemplu, asigură stabilitatea acestuia, iar la înghețată controlează formarea cristalelor de gheață și textura amestecului.

4.2 Industria nealimentară

Polizaharidele microbiene au numeroase utilizări și în alte industrii:

- ca agenți de suspendare în vopseluri, la lustruirea pielii și metalelor, la pigmenți și cerneluri pentru textile și hârtie;
- pentru controlul vâscozității;
- pentru gelificarea explozivelor, detergenților;
- pentru floculare la extracția minereurilor.

Cele mai folosite în scopurile amintite sunt xantanul și alginatul.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4.3 Recuperarea terțiară a țițeiului.

Polizaharidele pot fi utilizate pentru recuperarea țițeiului din zăcămintele uzate, în scopul măririi randamentului. Soluția de polimer deplasează țițeul, care altfel poate rămâne *in situ*, fiind înconjurat de apa injectată. Polimerul folosit în acest scop trebuie să aibă o dimensiune moleculară mică, pentru a putea trece prin porii rocilor, să dea o soluție cu vâscozitate mare care să nu fie afectată de concentrațiile mari de săruri, de temperaturile ridicate, de presiunile mari şi de forțele de forfecare existente în operațiile de pompare. Dintre polizaharidele care îndeplinesc aceste condiții cele mai indicate sunt xantanul şi scleroglucanul. Stabilitatea acestora la temperatură şi salinitate mare poate fi menținută pe perioade îndelungate. De exemplu, după 500 de zile la 90°C, scleroglucanul reține peste 90% din vâscozitatea sa originală, iar xantanul reține în aceleaşi condiții, aproximativ 75% din vâscozitatea originală.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOGRAFIE

1. ALCAMO, I.E.., 1997, *Fundamentals in Microbiology*. Fifth Edition. Benjamin Cummings. Addison Wesley Longman, Inc., Menlo Park. p. 722-786.
2. ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BACKWELL, M., 1996, Introductory Mycology, 4th Edition, John Wiley and Sons, Inc., New York.p. 274-275.
3. ATLAS, R.M., BARTHA, R., 1998, *Microbial Ecology. Fundamentals and Applications*. Fourth Edition. Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman, Inc., Menlo Park. p. 398-405; 599-615.
4. AXELSSON, L., 1998, *Lactic acid Bacteria: Clasification and Physiology*. În: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. Second Edition (Salminen, S., Wright, A., eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel. p. 1-72.
5. ÄYRÄPÄÄ, T., 1970, *Der Einfluss der Temperatur auf die Bildung hoherer Alkohole durch Kulturhefen*. Brauwiessenschaft, **23**, 2: 48-55.
6. ÄYRÄPÄÄ, T., 1971, *On the formation of higher alcohols by yeasts and its dependence on nitrogenous nutrients*. Pripp-Bryggerierna AB, Development and Control Section, Bromma, Sweden, p. 1-12.
7. BANU, C., 1987, *Biotehnologii în industria alimentară (Folosirea enzimelor şi microorganismelor în industria alimentară)*. Editura Tehnică, Bucureşti.
8. BARRAQUIO, V.L., SILVERIO, L.G., REVILIEZA, R.P., FERNANDEZ, W.L., 1980, *Whey utilization for single-cell protein production*. Phil. Agr., **63**: 103-110.
9. BERZESCU, P., KATRHREIN, I., 1991, *Biologia şi tehnologia drojdiilor de panificaţie şi de bere*, în: *Biologia şi tehnologia drojdiilor*, (sub red. I. Anghel), vol. II, Ed. tehnică, bucureşti, p. 212-300.
10. BLACK, J.G., 1996, *Microbiology: principles and applications*, Third Edition, Prentice Hall, New Jersey.
11. BRAKHAGE, A.A., 1998, *Molecular Regulation of β-Lactam Biosynthesis in Filamentous Fungi*. Microbiol. Molec. Biol. Rev., **62**, 3: 547-585.
12. BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., 1988, *Biology of Microorganisms*, 5th Edition, Prentice Hall, New Jersey, 835 p.
13. BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J., 1994, *Biology of Microorganisms*, Seventh Edition, Prentice Hall, International, Inc.
14. BUCHTA, K., 1983, *Lactic acid bacteria*. În: *Biotechnology*, vol. 3 (Rehm, H.J., Reed, G., eds.), Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida, Basel, p. 409-418.
15. BUIUC, D., 1999, *Identificarea fungilor patogeni*. În: *Tratat de Microbiolgie clinică*. (Buiuc, D., Neguţ, M., sub red..), Ed. Medicală, Bucureşti, p. 925-993.
16. BULAI, D., ENACHE, M., HERLEA, V., LAZAR, V., 1997, *Obtinerea si caracterizarea biochimica a bacteriocinelor produse de tulpini selectionate de Lactobacillus*. În: *Noutati in Microbiologie industriala şi Biotehnologie* (Manoliu, A., Comanescu, St., sub red), Ed. Corson, Iaşi, 696-704.
17. CHARPENTIER, M., 1968, *Dégradation de la cellulosae dans le sol. Mécanismes enzymatiques*. Ann, Inst, Pasteur, 117, 4: 497-538.
18. COMNEA, V., MARICA, M., 1977, *Studiul fenomenului de disociere şi efectul lui asupra activităţii α-amilazei la o tulpină de Bacillus subtilis*. Lucrările primului Simpozion de Microbiologie industrială, Iaşi, 1976, p. 169-176.
19. COONEY, C.L., CHOKYUN, R., TANNENBAUM, S.R., 1980, *Single-cell protein: engineering, economics and utilization in foods*. Advances in Food Research, **26**: 1-52.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

20. CRUEGER, W., CRUEGER, A., 1984, *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. (Brock, T.D., ed.), Sinauer Associates Inc., Sunderland, Science Tech., Inc. Madison, 308 p.
21. DAN, V., OANCEA, I., 1991, *Biologia şi tehnologia drojdiilor de vin*, în: *Biologia şi tehnologia drojdiilor*, (sub red. I. Anghel), vol. II, Ed. Tehnică, Bucureşti, p. 301 – 358.
22. DEMAIN, A.L., 1971, *Microbial production of food additives*. Symposia of the Society for General Microbiology. 21. *Microbes and Biological Productivity*. (Hughes, D.E., Rose, A.H., eds), Cambridge University Press, p. 78-83.
23. DEMAIN, A.L., 1972, *Cellular and Environmental Factors Affecting the Synthesis and Excretion of Metabolites*. J. Appl. Chem. Biotechnol., **22**: 345-362.
24. EBNER, H., FOLLMAN, H., 1983, Acetic Acid. În: *Biotechnology*, vol. 3 (Rehm, H.J., Reed, G., eds.), Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida, Basel, p. 387-407.
25. EINSELE, A., 1983, *Biomass from higher n-alkanes*. În: *Biotechnology*, vol. 3 (Rehm, H.J., Reed, G., eds.), Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida, Basel, p. 43-81.
26. ERICSSON, M., EBBINGHAUS, L., LINDBLUM M., 1981, *Single-cell protein from methanol: economic aspects of the Norprotein process*. J. Chem. Tech. Biotechnol., **31**: 33-43.
27. FAUST, V., PRÄVE, P., 1983, *Biomass from Methane and Methanol*. În: *Biotechnology*, vol. 3 (Rehm, H.J., Reed, G., eds.), Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida, Basel, p. 83 –108.
28. FÄHNRICH, P., IRRGANG, K., 1981, *Cellulase and protein production by Chaetomium cellulolyticum strains grown on cellulosic substrates*. Biotechnology Letters, **5**: 201-206.
29. FEDERICI, F., MARTINI, A., 1975, *Le proteasi extracellulari dei lieviti*. Bull. Soc. italiana di Biologia Sperimentale, **51**, fascicola 9-10, 572-574.
30. FRITSCHE, W., 1978, *Biochemische grundlagen der Industriellen Mikrobiologie*. VEB Gustav Fischer, Verlag Jena, 191 p.
31. FULLER, R., 1995, *Probiotics: Their development and use*. În: *Probiotics: Prospects of use in opportunistic infections*. (Fuller, R., Heidt, P., Rusch, V., Van der Waaij, D., eds.) Old Herborn University Press. p. 1-7.
32. GUEGUEN, M., 1995, *Les lévures, agents indispensables dans les industries agro-alimentaires*. Bull. Soc. Francaise Microbiol., **10**, 4: 273-278.
33. HAMDAN, I.Y., SENEZ, J.C., 1992, *The economic viability of Single Cell Protein (SCP) production in the twenty first century*. În: *Biotechnology – economic and Social Aspects. Issues for developing countries* (Da Silva, E.J.; Ratledge, C.; Sasson, A., eds). Cambridge University Press, p. 142-164.
34. HSU, T.A., LADISCH, M.R., TSAO, G.T., 1980, *Alcohol from cellulose*. Chem. Techn., 315-319.
35. HERLEA, V., 1978, *Studiul biologic al unor drojdii izolate din ape subterane si din depozite de ţiţei*, Analele Univ. Bucureşti, XXVII, 29-39.
36. HERLEA, V., 1985, *Selectarea tulpinilor de drojdii pe baza capacităţii de a utiliza inulina*, Rev. Roum. Biol., Biol. Veget., **30**, 2:137-141.
37. HERLEA, V., LAZAR, V., HULEA, S. A., MOGOS, S., 1989, *Selectarea unor tulpini de drojdii bune producătoare de acid L-ascorbic*, St. Cerc. Bioch., **32**, 2: 133-137.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

38. HERLEA, V., 1991, *Caracterizarea şi identificarea drojdiilor*, în: *Biologia şi tehnologia drojdiilor* (sub red. I. Anghel), vol. II, Ed. Tehnică, Bucureşti, p. 11-100.
39. HERLEA, V., LAZAR, V., CANJA, D., 1994, *Yeast as a Model Eukaryotic Cell – Biotechnological Implications*. În: *Proceeding of the 8th National Symposium of industrial Microbiology and Biotechnology* (Anghel, I., sub red.), Edit. Univ. Buc., 92-103.
40. HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY. J.T., WILLIAMS, S.T., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich, Sydney, Tokyo, p. 71-102.
41. HOPWOOD, D.A., 1984, *Gheneticeskoe programirovanie promîşlenîh mikroorganizmov*. În: *Promîlşlenaia mikrobiologhiia i uspehi gheneticeskoi injenerii*. Moscova *Mir* (traducere din lb. engleză), 171 p.
42. HÜTTER, R., 1971, *Regulation of amino-acids biosynthesis and industrial production of aminoacids. Radiation and Radioisotopes for Indistrial Microorganisms*. Vienna, p. 169-179.
43. IORDĂCHESCU, D., DUMITRU, I., 1990, *Biotehnologia producerii de enzime*. În: *Biotehnologii moderne*. (sub red. P. Raicu), Ed. Tehnică, Bucureşti, p. 155-201.
44. JOHNSON, E.A., 1999, *Anaerobic fermentations*. În: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Second Edition. (Demain, A.L., Davies, J.E., eds.). ASM Press, Washington, D.C., p. 139-150.
45. KINOSHITA, S., 1959, *The Production of amino acids by fermentation processes*. Adv. Appl. Microbiol., **1**: 201-214.
46. KOSARIC, N., WTECZOREK, A., COSENTINO,G.P., MAGEE, R.J., PRENOSIL, J.E.,1983, *Ethanol fermentation*. În: *Biotechnology*, vol. 3 (Rehm, H.J., Reed, G., eds.), Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida, Basel, 257 – 385.
47. LANZARINI, G., ZAMORANI, A., 1970, *Pectine e enzimi pectici. II. Indagine preliminare sugli enzimi prodotti da Aspergillus niger e Aspergillus usamii; influenza della pectina usata quale substrato*. Industria Conserve, XLV, **1**, 19-22.
48. LAZĂR, I., 1984, *Perspectiva tehnologiilor microbiene pentru creşterea recuperării ţiţeiului din zăcăminte*. Lucrările celui de-al patrulea simpozion de Microbiologie industrială, Galaţi, 1983, p. 29-37.
49. LEDERBERG, J., 1992, *Encyclopedia of Microbiology*, vol. 1 A-C, vol. 2 D-L, vol 3 M-R, vol 4. S-Z, Index Academic Press, Inc.
50. LEE, H-Y., FAN, L.T., 1980, *Properties and Mode of Action of Cellulase*. Adv. in Biochem Eng., **18**, 102-127.
51. LEOPOLD, H., WALTER, Z., 1970, *Zur Frage der Qualitätsverbesserung der Konidien von A. niger - Stämmen bei der Citronensäuregärung*. Zeitschrift fur Allg. Mikrobiol., **10**, 2: 121-127.
52. LEVEAU, J.Y., 1980, *Génétique microbienne: application et perspectives en biotechnologies*. Ind. Alimentaires et Agricoles, **11**: 1251-1257.
53. LEVI, J.D., SHENNAN, J.L., EBBON, G.P., 1979, *Biomass from liquid n-alkanes. Economic Microbiology*, vol. 4: *Microbial Biomass* (Rose, A.H., ed.), Academic Press, London.
54. MADIGAN, M., MARTINKO, J., PARKER, J., 1997, *Brock Biology of Microorganisms*, Eight edition, Prentice Hall International, International, Inc., p. 524-525.
55. MARTIN, J.F, DEMAIN, A.L., 1980, *Control of Antibiotic Biosynthesis*. Microbiological Rev., **44**, 2: 230-251.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

56. MÄYRÄ-MÄKINEN, A., BIGRET, M., 1998, *Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria.* În: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects.* Second Edition (Salminen, S., Wright, A., eds). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel. p. 73-103.
57. MONAGHAN, R.L., GAGLIARDI, M.M., STREICHER, S.L., 1999, *Culture Preservation and Inoculum Development.* În: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Second Edition. (Demain, A.L., Davies, J.E., eds.). ASM Press, Washington, D.C., p. 29-48.
58. MURRAY, H.C., 1976, *Microbiology of steroids.* În: *Industrial Microbiology* (Miller, B.M., Litsky, W., eds.), McGraw – Hill Book Company, New York, 465 p.
59. NAGARAYA, R., SREEKANTIAH, K.R., RAMACHANDRA RAO, T.N., 1970, *Studies on Fungal Proteolytic Enzymes.* Part I. *Selection and evaluation of strains to hydrolyze Proteins of animal and Plant Origin.* J. of Food Sci. and Technol., 7: 26-30.
60. NAKAMATSU, T., AKAMATSU, T., MIYAJINA, R., SHIIO, I., 1975, *Microbial Production of Glucose Oxidase.* Agr. Biol. Chem., **39**, 9: 1803-1811.
61. NASUNO, S., OHARA, T., 1973, *Purification of alkaline Proteinase from Aspergillus candidus.* Report of the Noda Inst. for Scientific Research, **17**, 39-44.
62. NUNHEIMER, T.D., BIRNBAUM, J., IHNEN, E.D., DEMAIN, A.L., 1970, *Product Inhibition of the Fermentative Formation of Glutamic Acid.* Appl. Microbiol. **20**, 2: 215-217.
63. OURA, E., 1983, Biomass from carbohydrates. În: *Biotechnology,* vol. 3 (Rehm, H.J., Reed, G., eds.), Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida, Basel, p. 3-41.
64. OURNAC, A., 1969, *Influence de l'origine de la thiamine (levure ou milieu) sur la vitesse de la fermentation alcoolique.* Ann. Technol. Agric., **18**, 3: 187-198.
65. PIENDL, A., 1971, *The Enzymatic Behavior of Bottom Flocculating and Non-flocculating Yeast during Fermentation.* Proceedings of the Annual Meeting of the American Society of Brewing Chemists, p. 63-79.
66. PONTECORVO, G., SERMONTI, G., 1977, *Parasexual Recombination in Penicillium chrysogenum.* În: *Industrial Microbiology* (Thoma, R.W., ed.), Dowden, Hutchinson and Ross, Inc., Stroudsburg, Pensylvania, p. 95-106.
67. POPA, L., 1972, *Rolul carbonatului de calciu în fermentația butirică.* În: *Influența unor substanțe organice şi minerale asupra fermentației butirice.* Teză de doctorat. Universitatea din Bucureşti. Facultatea de Chimie.
68. POPA, L., 1982, *Relația între agentul neutralizant folosit şi acumularea de valină în mediul de cultură a unor bacterii.* Lucrările celui de-al treilea Simpozion de Microbiologie industrială, Bucureşti, 1981, p. 202-207.
69. POPA, L., 1990, *Biotehnologii utilizate în producerea de proteine monocelulare neconvenționale.* În: *Biotehnologii moderne* (sub red. P. Raicu), Ed. Tehnică, Bucureşti, p. 202-221.
70. POPA, L., 1990, *Biotehnologii de producere a aminoacizilor cu ajutorul unor microorganisme.* În: *Biotehnologii moderne* (sub red. P. Raicu), Ed. Tehnică, Bucureşti, p. 239-256.
71. POPA, L., 1987, *Lucrări practice de Microbiologie industrială*, Tip. Univ. Bucureşti, 178 p.
72. PORTER, J.N., 1976, *Antibiotics.* În: *Industrial Microbiology* (Miller, B.M., Litsky, W., eds.). Mc. Graw-Hill Book Company, New-York, St. Louis, San Francisco, London, Sydney, Tokyo, Toronto. p. 60-78.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

73. RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S., DESHPANDE, V.V., 1998, *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. Microbiol. and Molecular Biol. Rev., 597-635.
74. RHODES, A., FLETCHER, D.L., 1966, *Principles of Industrial Microbiology*. Pergamon Press, Oxford, London, 320 p.
75. RODRIGUEZ, L., RUIZ, T., VILLANUEVA, J.R., SENTANDREU, R., 1978, *Yeast Invertase: Subcellular Distribution and Possible Relationship between the Isoenzimes*. Current Microbiology, **1**: 41-44.
76. RÖHR, M., KUBICEK, C.P., 1983, *Citric Acid*. În: *Biotechnology*, vol. 3 (Rehm, H.J., Reed, G., eds.), Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida, Basel, p. 419-454.
77. ROSE, A.H., 1984, *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 171 p.
78. ROSE, A.H., HARRISON, J.S., 1970, *The Yeasts*, vol. 3. Academic Press, London and New York, 545 p.
79. SASSON, A., 1988, *Biotehnologiile – sfidare şi promisiuni*. Editura Tehnică, Bucureşti.
80. SĂSĂRMAN, E., NEGOESCU, I., CERCEL, M., OLTEANU, V.,1982, *Conservarea microorganismelor producătoare de l-lizină şi acid L-glutamic în azot lichid*. Lucrările celui de-al treilea Simpozion de Microbiologie industrială, Bucureşti, 1981, p. 329-333.
81. SĂSĂRMAN, E., SÂRBU, C., MOCANU, E., DOBROVSKI, D.,1986, *Fuziunea protoplaştilor bacterieni şi analiza genetică a recombinanţilor*. Lucrările celui de-al V-lea Smpozion de Microbiologie industrială şi Biotehnologie, Iaşi, 1985, p. 661-664.
82. SĂSĂRMAN, E., SÂRBU, C., DOBROVSKI, D., MOCANU, E., JURCOANE, Ş., BUTNARU, C., 1988, *Obţinerea de recombinanţi prin fuziune de protoplasti. III Recombinanţi producători de lizină*. Lucrările celui de-al VI-lea Simpozion de Microbiologie industrială şi Biotehnologie, Iaşi, 1987, p. 531-537.
83. SĂSĂRMAN, E., JURCOANE, Ş., 2000, *Microbiologie industrială*. Ed. Mirton, Timişoara.
84. SCRIBAN, R., 1988, *Biotechnologie – Techniques et Documentation*. Lavoisier, Paris 906 p.
85. SCRIBAN, R., 1993, *Biotechnologie*, 4e edition. Tec.Doc. Lavoisier, Paris.
86. SEGAL, B., 1991, *Drojdiile ca aliment – medicament*, în : *Biologia şi tehnologia dro*jdiilor, (sub red. I. Anghel), vol. II, Ed. Tehnică, Bucureşti, p. 359 – 386.
87. SHINKE, R., KUNIMI, Y., NISHIRA, H., 1975, *Isolation and characterisation of β-Amylase Producing Microorganisms*. J. of Fermentation Technology, **53**, 10: 687-692.
88. SHINKE, R., KUNIMI, Y., AOKI, K., NISHIRA, H., 1977, *Relationship between* β-*Amylase Production and Sporulation in Bacillus cereus*. J. of Fermentation Technol., **55**, 2: 110-113.
89. SHINMYO, A., TERUI, G., 1970, *Kinetic Studies on Enzyme Production by Microbes*. (VII*). Kinetics of Acid Protease Induction in Aspergillus niger*. J. Ferment. Technol., **48**, 9: 519-524.
90. SIEVERS, M., TEUBER, M., 1995, *The microbiolgy and taxonooomy of Acetobacter europaeus in commercial vinegar production*. J. Appl. Bacteriol., Symposium Supplement, **79**: 843-953.
91. SIMEK, F., SZÈCHÈNY, E., 1969, *Recherche sur l'utilisation de produits pétroliers en vue de la production de levure fourragère*. Industr. alim. agr., 777-782.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

92. SIMON, P., MEUNIER, R., 1970, *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Masson et C^ie Editeurs, Paris, 567 p.
93. SINGLETON, P., SAINSBURY, D.,1997, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York.
94. SODA, K., TANAKA, H., ESAKI, N., 1983, *Amino Acids*. În: *Biotechnology*, vol. 3 (Rehm, H.J., Reed, G., eds.), Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida, Basel, p. 479-530.
95. STANCU, M., SEGAL, B., 1975, *Surse noi de proteine*. Ed. Tehnică, Bucureşti, 307 p.
96. STEWART, G.G., 1981, *The genetic manipulation of industrial yeast strains*. Canad. J. Microbiol., **27**: 10-11.
97. STURDZA, S, *MENCINICOPSCHI*, GH., BOLTAŞU, G., DUMITRU, E., 1984, *Conservarea microorganismelor industriale producătoare de enzime, utilizând tehnica desicării directe*. Lucrările celui de-al patrulea Simpozion de Microbiologie industirală, Galaţi, 1983, p. 155-161.
98. SUTHERLAND, J.W., 1983, *Extracellular polysaccharides*. În: *Biotechnology*, vol. 3 (Rehm, H.J., Reed, G., eds.), Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida, Basel, p. 531-574..
99. TALARO, K., TALARO, A., 1993, *Foundations in Microbiologie*, Wm.C. Brown Communications, Inc.. p. 734-757.
100. THOMA, R.W., 1977, *Industrial Microbiology*. În: *Benchmark Papers in Microbiology*. vol. 12, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania, p. 108-140.
101. TOBE, S., TAKAMI, T., HIROSE, Y., MITSUGI, K., 1975, *Purification and Some Properties of Alkaline Proteinase from Bacillus sp*. Agr. Biol. Chem., **39**, 9: 1749-1755.
102. TOPALĂ, N.D., 1977, *Realizările şi tendinţele de dezvoltare ale Microbieologiei industriale*. Lucrările primului simpozion de Microbiologie industrială Iaşi, 1976, p. 9-19.
103. TOPALĂ, N.D., 1982, *Microorganismele metilotrofe şi importanţa lor pentru industria de biosienteză*. Lucrările celui de-al treilea simpozion de Microbiologie industrială, Bucureşti, 1981, p. 31-46.
104. TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L., 1997, *Microbiology: An Introduction*, Sixth Edition. Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman, Inc., Menlo Park, p. 112-153; 750-757.
105. VALENTINE, R.C., 1964, *Bacterial ferredoxin*. Bacteriol. Rev., 28, 4: 497-515.
106. VASSU. T., ANGHEL, I., BREZEANU, A., 1988, *Consideraţii teoretice privind ameliorarea drojdiilor industriale*. Lucrările celui de-al VI-lea Simpozion de Microbiolgie industrială şi Biotehnologie, Iaşi, 1987, p. 605-612.
107. VINCENT, W.A., 1971, *Algae and lithotrophic bacteria as food sources. În: Microbes and biological productivity*, Symposim 21 (Hughes, D.E., Rose, A.H., eds.). Cambridge Universiy Press, p. 47-76.
108. WILKINSON, Y.F., 1971, *Hydrocarbons as source of single-cell protein*. În: *Microbes and Biological Productivity*, Symposium 21 (Hughes, D.E., Rose, A.H., eds.). Cambridge University Press, p. 15-47.
109. YAMADA, K., YOGO, M., 1970, *Studies of the utilization of hydrocarbons by microorganisms*. Part XV: *Yeast and Bacterial cell production from paraffin wax*. Agr. Biol. Chem., **34**, 2: 296-301.
110. ZARNEA, G., 1970, *Microbiologie generală*, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 677 p.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

111. ZARNEA, G., 1982, *Microorganismele, ingineria genelor şi viitorul biotehnologiilor*. Lucrările celui de-al treilea simpozion de Microbiologie industrială, Bucureşti, 1981, p. 18-30.
112. ZARNEA, G., 1984, *Tratat de Microbiologie generală*, vol. II, Edit. Acad. Române, Bucureşti, 474 p.
113. ZARNEA, G., 1986, *Tratat de Microbiologie generală*, vol. III, Edti. Acad. Române, Bucureşti, 639 p.
114. ZARNEA, G., 1994, *Tratat de Microbiologie generala*, vol. V, Edit. Acad. Romane, Bucuresti, 1078 p.
115. ZARNEA, G., DUMITRU, L., 1994, *Microorganisms biodiversity – a potential progress source in biotechnology*. În: *Proceedings of the 8th National Symposium of Industrial Microbiology and biotechnology* (Anghel, I., sub red), Bucharest, p. 15-45.
116. ZARNEA, G., TOPALĂ, N.D., 1987, 1988, *Biotehnologia şi societatea contemporană*. Lucrările celui de-al VI-lea simpozion de Microbiologie industrială şi Biotehnologie, Iaşi, 5-20.
117. ZARNEA, G., MENCINICOPSCHI, GH., BRĂGĂREA, ŞT., 1982, *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*. Edit. Tehnică, Bucureşti.

VERIFICAT 2017

VERIFICAT 2007

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tiparul s-a executat sub cda 780/2002
la Tipografia Editurii Universității din Bucureşti

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

DATA RESTITUIRII		
	20 SEP. 2019	
12. MAR. 2004		
	15 AUG. 2004	
15. APR. 2004		
24. MAI. 2005		
12. DEC. 2005		
23 APR. 2007		

BIBLIOTECA CENTRALA
UNIVERSITARA „CAROL I"

DE SPIRITU ET ANIMA

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

80 000 lei

ISBN: 973-575-613-7

Lei 80000

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro